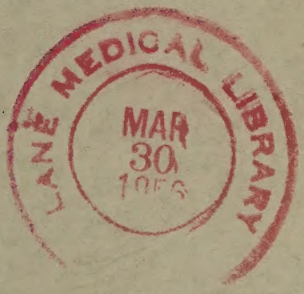
Leiden
1955

PATHO-PHYSIOLOGIE VAN LEUCOCYTEN EN THROMBOCYTEN



CHR. H. W. LEEKSMA

PATHO-PHYSIOLOGIE VAN LEUCOCYTEN EN THROMBOCYTEN

PATHO-PHYSIOLOGY OF LEUCOCYTES AND PLATELETS

With a summary in English

PROEFSCHRIFT
TER VERKRIJGING VAN DE GRAAD VAN DOCTOR IN DE GENEESKUNDE AAN DE RIJKSUNIVERSITEIT TE LEIDEN OP GEZAG VAN DE RECTOR MAGNIFICUS DR J. N. BAKHUIZEN VAN DEN BRINK, HOOGLERAAR IN DE FACULTEIT DER GODGELEERDHEID, TEGEN DE BEDENKINGEN VAN DE FACULTEIT DER GENEESKUNDE TE VERDEDIGEN OP WOENSDAG 27 APRIL 1955, DES NAMIDDAGS TE 4 UUR

DOOR

CHRISTIAAN HENDRIK WILLEM LEEKSMA
GEBOREN TE HEUKELUM (ZH)
IN 1915

UITGEVERIJ EXCELSIOR — Oranjeplein 96 — 's-GRAVENHAGE

PROMOTOR: PROF.DR A. QUERIDO

AAN MIJN VROUW

Dit proefschrift werd bewerkt op de afdeling voor Interne Geneeskunde van de Gemeente-Ziekenhuizen te 's-Gravenhage en op de afdeling Endocrinologie en Stofwisselingsziekten, Academisch Ziekenhuis te Leiden.

Zonder de voortdurende belangstelling en de technische hulp die ik gekregen heb van Dr J. A. Cohen (Medisch-Biologisch Instituut van de R. V. O. -T. N. O. te Rijswijk), die ook het gebruikte DFP^{32} verstrekte was dit onderzoek niet mogelijk geweest.

Veel dank ben ik verschuldigd aan Dr H. van Wely voor de wijze waarop hij mij de gelegenheid geboden heeft tot experimenteel werken.

Prof. Dr A. Querido ben ik zeer erkentelijk voor zijn belangstelling en adviezen tijdens het onderzoek.

Veel profijt heb ik gehad van de openhartige critiek van Dr A. A. H. Kassenaar en de hulp die hij mij bij het bewerken van dit proefschrift geboden heeft.

Dr C. L. Harders en den Heer J. M. van Mulken (laboratorium van de Gemeente-Apotheek te 's-Gravenhage) ben ik zeer dankbaar voor de medewerking die ik van hen mocht ontvangen. Van de vele anderen die hun medewerking verleenden bij het tot stand komen van dit proefschrift, geldt mijn erkentelijkheid in het bijzonder Mej. E. Elgersma, Mej. C. H. Posthumus en Mej. M. Stolk.

INHOUD

Inleiding

Hoofdstuk 1 Literatuuroverzicht over de biochemie van leucocyten 11

Hoofdstuk 2 Literatuuroverzicht over de biochemie van thrombocyten 17

Hoofdstuk 3 Isolatiemethoden van de leucocyten 21

Hoofdstuk 4 Isolatiemethoden van de thrombocyten 25

Hoofdstuk 5 Onderzoek naar de biochemie van de leucocyten 27
I Inleiding 27
II Experimentele methoden 27
III Experimentele resultaten 29
IV Bespreking van de resultaten 38
V Phosphatasebepalingen in de cellen van het beenmerg 39

Hoofdstuk 6 Onderzoek naar de biochemie van thrombocyten 42
I Inleiding 42
II Experimentele methoden 42
III Resultaten van de zure phosphatase bepalingen in de thrombocyten 47
IV Resultaten van het onderzoek met P^{32} naar de aanwezigheid van een DNA-fractie in de thrombocyten 52
V Bespreking van de resultaten 53

Hoofdstuk 7 Onderzoek naar de levensduur van leucocyten en thrombocyten met DFP^{32} 57
I Literatuurgegevens 57
II Experimentele methoden 65
III Experimentele resultaten 68
IV Bespreking van de resultaten 72
V Bepaling van het bestralingsrisico 76

Hoofdstuk 8 Levensduur van de thrombocyten onder bijzondere omstandigheden 79

Samenvatting 87

Summary 90

Literatuur 94

INLEIDING

Grote veranderingen in aantal en hoedanigheid van de thrombocyten kan men niet alleen bij vele bloedziekten, zoals polycythaemia vera (1) en chronische myeloide leukaemie (2), maar ook bij tal van andere ziekten, zoals carcinomen en infectieziekten waarnemen (3, 4).

Veelvuldig is de laatste jaren de chemische samenstelling van de leucocyten onderzocht. Hierbij is het mogelijk gebleken, bij bepaalde aandoeningen enige belangrijke verschillen in biochemische samenstelling en enzymactiviteit van de leucocyten aan te tonen. Dergelijke verschillen waren ook aanwezig in gevallen, waar men op grond van de histologische gegevens geen onderscheid kon maken. Deze belangrijke vondst, dat morphologisch gelijke leucocyten sterke verschillen vertonen in chemische samenstelling, gaf ons aanleiding na te gaan of dergelijke verschillen ook in de thrombocyten aanwezig zijn. Men is de laatste tijd steeds meer geneigd aan te nemen, dat de verschillende soorten beenmergcellen op verschillende prikkels als een eenheid reageren. Reeds lang werd aangenomen (5, 6) (en door Dameshek is hierop enige tijd geleden nog eens de nadruk gelegd (7)) dat bij ziektebeelden zoals polycythaemia vera en chronische myeloide leukaemie geen proliferatie van één celsoort bestaat, maar dat alle beenmergcellen bij het proces betrokken zijn. Zowel bij polycythaemia vera als bij chronische myeloide leukaemie kan een sterke thrombocytose het meest op de voorgrond tredende verschijnsel zijn en door de hierbij optredende neiging tot thrombose en bloedingen het ziektebeeld klinisch geheel beheersen. Dit gezamenlijk reageren van de beenmergcellen komt ook bij andere ziektetoestanden voor, o. a. na bloedingen en ernstige haemolyse, waarbij naast een reticulocytose, als een teken van verhoogde erythropoietische activiteit, ook een leucocytose en thrombocytose gevonden worden.

Een ander vraagstuk waarmee wij ons bezig gehouden hebben, is dat van de overlevingsduur van de thrombocyten. In tegenstelling tot het uitgebreide onderzoek dat ingesteld is naar de levensduur van de erythrocyten is nog slechts weinig aandacht besteed aan de levensduur van de thrombocyten. Toch zijn er redenen om te veronderstellen dat kennis hiervan van betekenis is, omdat zij misschien een verklaring geeft voor het gedrag van de thrombocyten na operaties (8) en bloedingen,

bij behandeling van bloedziekten (9) en tumoren met cytostatische stoffen. De resultaten door Cohen e.a. verkregen met DFP^{32} voor het bepalen van de levensduur van de erythrocyten (10) bracht ons ertoe te onderzoeken of deze stof ook voor onze doeleinden gebruikt zou kunnen worden.

Bij een onderzoek naar de biochemie van de thrombocyten is een kleine bijmenging van leucocyten en erythrocyten een groot gevaar Dit is het gevolg van het veel grotere volume van deze cellen, dat voor leucocyten op 60 - 70 maal en voor erythrocyten op 10 - 12 maal dat van de thrombocyten gesteld kan worden. Een bijmenging van één leucocyt op duizend thrombocyten zal dus betekenen dat zes tot zeven procent van het celvolume uit leucocyten bestaat. Hierom was het nodig in de leucocyten dezelfde bepaling als in de thrombocyten te verrichten. Bij enkele proeven leek het gewenst ook de erythrocyten bij het onderzoek te betrekken.

In dit proefschrift worden, na een literatuuroverzicht over enkele aspecten van de biochemie van leucocyten en thrombocyten, de resultaten van enige onderzoekingen aangaande de biochemie van leucocyten en thrombocyten medegedeeld. Vervolgens wordt een onderzoek naar de levensduur van de leucocyten en thrombocyten met behulp van DFP^{32} beschreven, waarna van de gevonden waarde voor de levensduur van de thrombocyten de mogelijke betekenis voor het gedrag van deze cellen besproken wordt.

Hoofdstuk 1

LITERATUUROVERZICHT OVER DE BIOCHEMIE VAN LEUCOCYTEN

De biochemische samenstelling en de stofwisseling van de leucocyten worden al sinds lang onderzocht. Het tempo van onderzoek is de laatste jaren aanmerkelijk versneld. Aan de ene kant is dit een gevolg van de grote mogelijkheden geboden door verbeterde isolatiemethoden van de leucocyten en hun bestanddelen en de talrijke nieuwe methoden van biochemisch onderzoek. Aan de andere kant is een grote stimulans uitgegaan van de haematologische complicaties bij het gebruik van röntgenstralen, bij de toepassing van radioactieve isotopen, bij atoomexplosies en bij behandeling met cytostatische stoffen en andere geneesmiddelen.

Ook de gestegen behoefte aan bloed en bloedproducten en de daarmee samenhangende uitbreiding van de laboratoria voor de bloedtransfusiediensten en de ontwikkeling van de immunohaematologie hebben niet nagelaten bevruchtend te werken. Hierbij komt nog dat de leucocyt, een thans eenvoudig bereikbare en te isoleren lichaamscel, wat zijn biochemische samenstelling en enzymsystemen betreft in vele opzichten als model kan dienen voor de andere kernhoudende cellen van het menselijk organisme en dientengevolge als een belangwekkend object voor biochemisch onderzoek beschouwd moet worden. De leucocyt heeft een hoog gehalte aan enzymen en is in metabolisch opzicht zeer actief. Leucocyten verbruiken zuurstof en zijn in staat tot aerobe en anaerobe glycolyse (11). Ook heeft de leucocyt het vermogen bepaalde aminozuren actief intracellulair te concentreren. Zo toonden Zamecnik en Baker (12) aan, dat met C^{14} gemerkt DL-leucine met een constante snelheid in de geisoleerde cellen wordt opgenomen; Weisberger e.a. (13) vonden dat met S^{35} gemerkt L-cystine en L-methionine actief door de leucocyten opgenomen worden. Een uitstekend overzicht van de kennis tot 1951 gaf Valentine (14).

Hoewel men de biochemische samenstelling en enzymactiviteit van de leucocyten dikwijls had onderzocht, waren tot voor kort nog slechts zelden systematisch quantitatieve onderzoekingen gedaan bij bepaalde ziektebeelden. Reeds lang was door het werk van Code (15) bekend, dat het histaminegehalte van

het bloed verhoogd is bij chronische myeloide leukaemie. Door Graham e. a. (16) is aangetoond, dat veel van het histamine in het periphere bloed afkomstig is uit de basophiele cellen. Dit werd bevestigd door Code en Mitchell (17) en door Ehrich (18). Deze laatste analyseerde enige vroegere publicaties over het histaminegehalte in de leucocyten bij chronische myeloide leukaemie en uitte de veronderstelling, dat er een correlatie bestond tussen het histaminegehalte in het periphere bloed en het hierin aanwezige aantal basophiele cellen. Valentine e. a. (20) konden dit aan de hand van waarnemingen bij patienten met chronische myeloide leukaemie met sterke basophilie bevestigen. Door Wagner is aangetoond, dat het bloedglycogeen bijna uitsluitend voorkomt in de leucocyten en vermeerderd is bij polycythaemia vera (21).

Door histochemisch onderzoek heeft men niet alleen gegevens verzameld over het voorkomen en de plaats van bepaalde chemische bestanddelen en enzymen in de cellen, maar in sommige gevallen ook een zeker inzicht verkregen in quantitatieve variaties van deze stoffen bij bepaalde klinische toestanden die gepaard gaan met afwijkingen in de leucocyten. Zo vond Wachstein (22) door histochemisch onderzoek wisselende hoeveelheden alkalische phosphatase in de granulocyten; de intensiteit van de reactie nam toe bij infecties en polycythaemia vera; daarentegen was de phosphataseactiviteit sterk gedaald bij chronische myeloide leukaemie. Gibbs en Stowell (23) bevestigden histochemisch de door Wagner gevonden vermeerdering van het glycogeen in de leucocyten bij polycythaemia vera. Voortbouwend op deze gegevens stelden Valentine, Beck e. a. een uitgebreid onderzoek in bij gezonden en bij een reeks patienten met verschillende ziektebeelden. Hun belangstelling ging vooral uit naar de z. g. myeloproliferatieve syndromen. Myeloproliferatieve syndromen is de naam welke Dameshek (7) voorgesteld heeft voor een groep van ziektebeelden, die een abnormale proliferatie van beenmergcellen gemeen hebben. Tot deze syndromen behoren chronische myeloide leukaemie, polycythaemia vera en ook een ziektebeeld dat in zijn verschijningsvorm moeilijk van de eerstgenoemde ziektebeelden te onderscheiden is, n. l. dat van de myelofibrose of myelosclerose met extramedullaire haematopoiese. Dit ziektebeeld kan soms veel punten van overeenkomst met polycythaemia vera vertonen (waarbij vooral in latere stadia een myelofibrose voor kan komen), soms meer gelijken op een chronische myeloide leukaemie. Het is altijd een strijdvraag geweest waartoe men deze ziektebeelden rekenen moet. Ook is men het er niet over eens of men de extramedullaire haematopoiese moet opvatten als compensatoir voor de mergfibrose, of dat men de extramedullaire haematopoiese en de mergfibrose beide moet zien als een gevolg van dezelfde aan het ziektebeeld ten grondslag liggende prikkel van het reticulum. Het laatste is men tegenwoordig meer geneigd aan te nemen (24). Van de

resultaten van hun onderzoekingen hebben bovengenoemde auteurs in een aantal publicaties mededeling gedaan (25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 33, 34, 35).

Bij bepalingen van het alkalische-phosphatasegehalte (25, 26, 27) werden belangrijke verschillen gevonden. Het normale gehalte van geisoleerde leucocyten, uitgedrukt als mg P vrijgemaakt per uur uit 10^{10} leucocyten bedroeg 13, 4-58. Het alkalische-phosphatasegehalte van de leucocyten bij chronische myeloide leukaemie bleek sterk verlaagd te zijn (0-14, 4). In één geval slechts was het hoger dan 7, 2; dit betrof een patient met een uitgebreide huidinfectie, bij wie de waarden voor en na deze infectie aanzienlijk lager waren. Bij polycythaemia vera werd in 17 gevallen, waar tevens afwijkingen van de leucocyten aanwezig waren of geweest waren, het alkalische phosphatase sterk verhoogd gevonden: gemiddeld 77; slechts in enkele gevallen werden waarden aan de bovengrens van het normale gevonden. De waarden waren onafhankelijk van het meer of minder leukaemoide karakter van het bloedbeeld, de phase van de ziekte, de toegepaste behandeling (o. a. miltextirpatie) of de aanwezigheid van osteoclerose. In geen geval werden waarden gevonden even laag als bij chronische myeloide leukaemie, gemiddeld waren zij 20 maal zo hoog. Aanzienlijk verhoogd was ook het alkalische-phosphatasegehalte bij leucocytosen tengevolge van infecties, hartinfarct, trauma, partus, zwangerschap. Bij primair chronisch rheuma, acuut rheuma, lupus erythematodes is er gewoonlijk geen stijging (28), zelfs niet als de toestand van de patient ernstig is, zoals bij lupus erythematodes. ACTH in hoge dosis en in mindere mate cortison geeft een stijging; deze is echter slechts tijdelijk.

Glycogeenbepalingen (27, 29) gaven de volgende uitkomsten: normalen gem. 75, 1 (47, 2-118, 6) mg per 10^{10} granulocyten; chronische myeloide leukaemie gem. 37, 9 (12, 9-72, 2); polycythaemia vera gem. 116, 2 (88, 0-164); leucocytosen bij infecties gem. 86, 7. Bij ongecompliceerde diabetes waren in het algemeen de waarden normaal, cortisontherapie had weinig invloed. Opvallend is dat de waarden vrijwel parallel gaan met die van het alkalische phosphatase: bij chronische myeloide leukaemie zijn beide laag, bij polycythaemia vera en infecties beide hoog. In hoeverre men hier verband moet leggen met de waarneming bij histochemisch onderzoek, dat glycogeen en alkalische phosphatase in verschillende celsoorten op dezelfde plaatsen in de cel aanwezig zijn, is niet bekend (19). Bij gevallen van myelofibrose en myelosclerose met extramedullaire haematopoiese werden waarden van het alkalische phosphatase en het glycogeen gevonden, die soms met die bij chronische myeloide leukaemie, soms met die bij polycythaemia vera, soms met geen van beide overeenkwamen.

Onderzoekingen van de β-glucuronidase-activiteit (30) toonden aan, dat deze laag was bij acute leukaemieën en bij alle an-

dere ziektebeelden, die gepaard gaan met lymfocytose. Cortison had geen invloed op de glucuronidaseactiviteit. Deze resultaten zijn ten dele in tegenspraak met die van Anlyan e.a. (32), die een stijging vonden terminaal bij chronische myeloide leukaemie en acute myeloide leukaemie.

Het glucuronzuurgehalte werd verlaagd gevonden bij acute leukaemieën, lymfatische leukaemieën, mononucleosis infectiosa en andere toestanden, die gepaard gaan met lymfocytose (31).

Onderzoekingen van het koolhydraatmetabolisme van de leucocyten leverden de volgende gegevens op (33, 34): leucocyten hadden een overwegend aeroob glycolytisch metabolisme; met glucose en hexose-diphosphaat als substraat waren zuurstofverbruik en melkzuurproductie aanzienlijk hoger bij normalen dan bij patienten met chronische lymfatische en myeloide leukaemie. Ook werd de invloed nagegaan van verschillende substraten en cofactoren; hierbij bleek dat door succinaat de zuurstofopneming sterker gestimuleerd werd bij gezonden dan bij leukaemie-patienten. Leukaemische cellen behoefden, om tot maximale zuurstofopneming te komen meer cytochroom dan normale cellen. Homogenaten van cellen van patienten met chronische lymfatische leukaemie behoefden abnormaal veel diphosphorpyridine-nucleotide om een maximale melkzuurproductie te bereiken. Normale cellen toonden bij variaties in de cofactoren een grotere labiliteit in hun zuurstof- en glucoseverbruik. Daarentegen waren leukaemische cellen weer wisselend in hun melkzuurproductie. Wagner e. a. (38, 39, 40) toonden aan, dat de glycogeenafbraak in paardenleucocyten op dezelfde wijze verliep als in lever en spieren en dat dit een gevolg was van de aanwezigheid van phosphorylase.

In tegenstelling met de onderzoekingen van Contopoulos en Anderson (36), die een vermeerderd sulfhydrylgehalte van de leucocyten bij chronische myeloide leukaemie en lymfatische leukaemie gevonden hadden, constateerden Harden, Valentine en Lawrence (35) normale waarden bij chron. myeloide leukaemie en chron. lymfatische leukaemie. Bij deze laatste aandoening was weliswaar het gehalte per cel verlaagd, maar daar leukaemische lymfocyten een stikstofgehalte hebben, dat slechts de helft is van dat van normale en dat van de leucocyten bij chron. myeloide leukaemie, was het gehalte per gram N normaal.

Swendseid e. a. (37) ontdekten, dat bij patienten met lymfatische en myeloide leukaemie de nucleotidaseactiviteit van de granulocyten 10 maal zo hoog was als die van de lymfocyten; de adenosinetriphosphatase- en pyrophosphataseactiviteit was evenwel bij beide celsoorten gelijk.

Martin (41) vond bij het onderzoek naar de stofwisseling van leucocyten dat toevoeging van succinaat aan het substraat geen metabolisch effect had bij intacte cellen, maar zeer sterk effect na lysis van de cellen. Ook onderzochten hij en zijn mede-

werkers (42) de invloed van glucose, fructose en insuline op de stofwisseling van de leucocyten bij gezonden en diabetici. Zij vonden dat de leucocyten van diabetici minder lactaat produceerden bij de aanwezigheid van glucose, deze leucocyten gaven meer melkzuur van fructose dan van glucose, insuline veroorzaakte geen stijging van de lactaatproductie met fructose; op insuline reageerden leucocyten van normalen niet, die van diabetici met een verhoogde melkzuurproductie. Dezelfde onderzoekers ontdekten dat cortison en hydrocortison een directe werking hadden op leucocyten, mits deze niet beschadigd waren (43). Deze hormonen gaven nl. een verminderde lactaatproductie bij gelijk gebleven zuurstofverbruik. Mc. Kinney (44) vond, dat leucocyten een glyoxylaseactiviteit bezitten. Rossiter en Wong (45) toonden aan, dat het reeds eerder door Berger (46) gevonden lipase in de leucocyten een esterase is, dat het vermogen heeft de triglyceriden van laag moleculair gewicht te splitsen. Ook vonden zij dat in de leucocyten geen cholinesterase aanwezig was.

In het bovenstaande overzicht, dat geenszins volledig is, is getracht enigszins een beeld te geven van het uitgebreide onderzoek dat naar de leucocyten gedaan is en van de grote mogelijkheden die dit onderzoek biedt door de overeenkomst tussen deze cellen en andere cellen uit het menselijk organisme, waardoor zij bij algemene stofwisselingsstoornissen ook bij het proces betrokken zijn (zie het resultaat bij diabetici, ook is bij glycogeenziekte het gehalte aan glycogeen van de leucocyten mede verhoogd (47)). De biochemische verschillen, die men b. v. gevonden heeft bij de myeloproliferatieve syndromen, hebben ons inzicht in bepaalde klinische problemen verdiept, o. a. in de overgang van polycythaemia vera in chron. myeloide leukaemie. Valentine e. a. vonden nl. dat de typische afwijkingen in de biochemische samenstelling van de leucocyten bij polycythaemia vera bleven bestaan ook in die gevallen, waar tijdens het verloop van de ziekte een beeld ontstond, dat klinisch en morphologisch moeilijk van chron. myeloide leukaemie te onderscheiden was (27). Ook Williams e. a. (48) deden een dergelijke waarneming bij een atypisch geval van polycythaemia vera eindigend in een myeloblastenleukaemie. Het alkalische-phosphatasegehalte van de leucocyten gaf hier n.l. geen aanknopingspunten voor een overgangsphase van chron. myeloide leukaemie, hoewel morphologisch onderzoek hier wel op wees. Ook is uit deze onderzoekingen duidelijk geworden, dat morphologisch gelijke leucocyten verschillend van samenstelling kunnen zijn, en dat bepaalde afwijkingen in het biochemisch gedrag van de leucocyten bij sommige ziektebeelden constant voorkomen.

De verschillen tussen myeloide leukaemie en polycythaemia vera doen veronderstellen, dat men hier met twee fundamenteel verschillende stofwisselingsstoornissen te maken heeft. Ook is het thans mogelijk het probleem, welke plaats de ge-

vallen van myelofibrose met extramedullaire haematopoiese te midden van andere myeloproliferatieve syndromen moeten innemen, van een andere kant te benaderen dan de klinische en morphologische. De afwijkingen in het alkalische-phosphatase- en glycogeengehalte van de leucocyten bij chron. myeloide leukaemie schijnen al heel vroeg tijdens het verloop van de ziekte duidelijk te zijn. Zo deden Moloney en Lange (49) bij enkele slachtoffers van atoomexplosies, die later een chron. myeloide leukaemie kregen, glycogeen- en alkalischephosphatasebepalingen, zodra de eerste afwijkingen in het periphere bloed ontstonden. Ook toen al bleken phosphatase en glycogeen verlaagd te zijn, dus lang voor de ziekte klinisch manifest werd. Belangwekkend is, dat stijging van het alkalischephosphatase- en glycogeengehalte van de leucocyten bij polycythaemie voorkomt in gevallen waar aantal en morphologie geen veranderingen te zien gaven. Valentine en Beck komen tot de conclusie, dat de door hen gevonden waarden ervoor pleiten dat vele van de myeloproliferatieve syndromen diffuse dysplasieën van het reticulum zijn; verschillende storingen in het metabolisme van de cellen, die niet noodzakelijk van hetzelfde type hoeven te zijn of een zelfde oorzaak te hebben, zouden aanleiding kunnen geven tot morphologisch gelijke maar in metabolisch opzicht verschillende ziektebeelden. Hun bevindingen geven geen steun aan de hypothese van Dameshek, dat deze syndromen slechts wisselende reacties zouden zijn op een enkel, het merg stimulerend principe (7).

Tot nu toe is men er niet in geslaagd een verklaring te vinden voor de waargenomen verschillen, een verklaring die van grote betekenis zou kunnen zijn niet alleen omdat hiermee misschien meer licht geworpen wordt op het wezen van bepaalde bloedziekten, maar ook omdat deze wetenschap van belang zou kunnen zijn voor het inzicht in andere aandoeningen. Het is nl. niet ondenkbaar dat afwijkingen in samenstelling van de cellen zoals bij leukaemieën gevonden zijn, ook bij andere tumoren zouden kunnen voorkomen. Het vinden van quantitatieve variaties in biochemische patronen van neoplastische cellen zou wellicht kwetsbare gebieden voor de aanval op de maligne cel kunnen aanwijzen.

Hoofdstuk 2

LITERATUUROVERZICHT OVER DE BIOCHEMIE VAN THROMBOCYTEN

Van morphologisch standpunt bezien is een thrombocyt een onvolledige cel, er ontbreekt een kern en een fijnere structuur aan (67). De grootte in het periphere bloed varieert van 1 tot 5μ, ook komen er reusvormen voor. Men heeft getracht door het percentage grotere en kleinere thrombocyten vast te stellen tot een differentieel-telling te komen (51, 52). De betekenis van de verschillen in grootte is echter onbekend; ook bestaan geen morphologische criteria voor de bepaling van de leeftijd van een thrombocyt, slechts zou sterke basophilie op onrijpheid wijzen. In de thrombocyten vindt men een hyalomeer en een granulomeer; het smalle, weinig of niet gegranuleerde hyalomeer omzoomt het azurophiele granulomeer. Algemeen wordt thans de theorie van Wright aanvaard (53), volgens welke de thrombocyten ontstaan uit cytoplasma-uitstulpingen van de megacaryocyten. Aan de megacaryocyten (normaliter de enige reuscellen van het beenmerg), die het eerst waargenomen zijn door Howell (54) zijn veel studies gewijd. (55, 56, 57, 58, 59). Een uitgebreid overzicht over de kennis van de thrombocyten is in 1938 gegeven door Tocantins (60).

De laatste jaren is de morphologie van de thrombocyten dank zij de ontwikkeling van de phasencontrast- (61) en de electronenmicroscoop (62, 63, 64, 65, 66) veelvuldig onderzocht. De thrombocyten zijn, meer nog dan de erythrocyten en leucocyten, geschikt voor electronenmicroscopie door hun kleine diameter en doordat zij zich vlak uitspreiden. Met phasencontrast-microscopie heeft men kunnen waarnemen dat van het oppervlak van de thrombocyten vele kleine fibrillen uitgaan, Volgens Tullis (67) zouden deze mogelijk een inleidende activering van thrombocyten vóór het optreden van chemische stolling betekenen en zouden zij afhankelijk zijn van O_2 en CO_2 spanning. Mogelijk hangt deze fibrilvorming aan de oppervlakte samen met de z. g. „kleverigheid" van de thrombocyten. Zo zou men kunnen verwachten, dat oudere thrombocyten minder snel fibrillen vormen dan jongere.

Talrijke methoden zijn uitgedacht voor het tellen van de thrombocyten. Volgens Tocantins waren in 1933 reeds 134

verschillende methoden beschreven (68). De beste tot nu toe lijkt die van Feissly en Lüdin (69), waarbij slechts een verdunning van het bloed van 1 op 20 à 25 noodzakelijk is en de thrombocyten lange tijd fraai te zien zijn. Dikwijls is een onderzoek ingesteld naar het volume van de thrombocyten (70, 71, 72, 73, 74); sterk uiteenlopende waarden zijn gevonden. Ook de betekenis van de thrombocyten bij de hemostasis heeft men veelvuldig nagegaan; bij vrijwel iedere phase van de stolling vervullen zij een functie:

1. mechanisch bloedstelpend: agglutinaten van thrombocyten dichten in de eerste phase van de bloedstelping defecten in de vaatwand (75).
2. bij uiteenvallen geven zij een vasoconsctrictorische stof af, het serotonine (76, 89, 90, 92).
3. in thrombocyten zijn enzymen en andere factoren aanwezig, o. a. voor de vorming van thromboplastine, de omzetting van prothrombine in thrombine en fibrinogeen in fibrine (77, 78, 79).
4. thrombocyten zijn onmisbaar voor de retractie van het stolsel, de betekenis hierbij van de thrombocyten is door de onderzoekingen van Budtz-Olsen (80) veel duidelijker geworden.
5. thrombocyten dienen voor het handhaven van de integriteit van de vaatwand, waarschijnlijk door een stof af te geven die nodig is voor de vorming van intercellulair cement (81, 82, 83, 84).
6. in thrombocyten is de aanwezigheid van een antifibrinolysine aangetoond (85).

Thrombocyten verbruiken zuurstof (86, 87, 88, 123), maar zij zouden weinig of geen glucose verbruiken (67) en geen melkzuur vormen. Bij een onderzoek naar het zuurstofverbruik van thrombocyten in het laboratorium van de R. V. O. der T. N. O. bleek, dat thrombocyten alleen zuurstof opnemen bij de aanwezigheid van glucose (91). Maupin vond een O_2 gebruik van gemiddeld 80 $mm^3/10^{10}$ thrombocyten per uur (87).

In tegenstelling met leucocyten wordt geen met C^{14} gemerkt DL-leucine in het thrombocyten-eiwit opgenomen (93). Cytochemisch zijn in de thrombocyten polysacchariden aangetoond (94, 95, 96, 97), welke dezelfde kenmerken vertoonden als die in de megacaryocyten (98). Men heeft deze wel voor glycogeen gehouden (95, 97), dit is echter niet juist gebleken (111). Veel strijd is er geweest over het al dan niet voorkomen van kernsubstantie in de thrombocyten. Waren zelfs voor kort nog sommigen van mening dat dit wel het geval was (99, 100, 101, 102, 103), door de onderzoekingen van de laatste jaren heeft men op velerlei wijzen het tegendeel aannemelijk kunnen maken. Zo bleek de Feulgen-reactie negatief te zijn (104, 105) en het voor nucleinezuren typische absorptiemaximum in het ultraviolet te ontbreken (106, 119). Met Schneiders methode van fractionnering was het ontbreken van nucleinezuren aan te tonen

(87), dit is in overeenstemming met eigen onderzoekingen met P^{32}. Wel vindt een aanzienlijke opname plaats van P^{32} in de thrombocyten (108, 109, 110, 112). Evenmin als in de granulocyten (in tegenstelling tot de lymfocyten) is in de thrombocyten ribonucleinezuur aan te tonen (113).

In tegenstelling met rattenthrombocyten (124) ontbreekt in menselijke thrombocyten een cholinesterase (107), wel is een andere esterase in aanzienlijke hoeveelheid in menselijke thrombocyten aanwezig (114). In overeenstemming met eigen waarnemingen werd door verschillende onderzoekers in de thrombocyten een zure phosphatase gevonden (87, 114, 115). Met Na-beta-glycerophosphaat als substraat werd geen alkalische phosphatase aangetoond (114, 115) wel met Na-alpha-glycerophosphaat (115). Andere enzymen, welke men in de thrombocyten gevonden heeft, zijn histaminase (117), glucuronidase (114), pyrophosphatase (116), nucleotidase (115) en een polypeptidase (115). Salvidio vond dat het gehalte aan dit enzym tijdens de eerste dagen van de menstruatie verhoogd was, evenals (in mindere mate) dat van het alkalische phosphatase. Het gehalte aan zure phosphatase daarentegen bleef gelijk. In de thrombocyten konden niet worden aangetoond: lipase, sulfatase, carboxypeptidase, chymotrypsine (114). Menselijke thrombocyten bleken een aanzienlijke dehydrogenase-activiteit té bezitten (118); de meest actieve enzymen waren die, welke inwerkten op Na-succinaat, Na-1-malaat en Na-alpha-glycerophosphaat.

Erickson e. a. hebben bij patienten en gezonden een onderzoek ingesteld naar het lipoid- en eiwitgehalte (120). Zij vonden in de droge stof een totaal vetgehalte van 15%, als volgt verdeeld: phospholipoiden 11%, cholesterol 2%, cholesterolesters 1%, neutraal vet 1%; 64% van het drooggewicht bleek uit eiwit te bestaan. Dezelfde uitkomsten verkregen zij bij patienten met haemophilie en thrombopenische purpura na splenectomie. De verkregen waarden komen overeen met die van het stroma van de erythrocyten. Ongeveer dezelfde uitkomsten werden verkregen door Maupin (87). Verschillende keren is het gehalte aan mineralen van de thrombocyten onderzocht (121, 122, 123). Hierbij werd een gehalte aan K gevonden dat veel lager was dan aan Na. Deze bepalingen werden echter gedaan in gedroogde thrombocyten. Bij eigen onderzoek werd gevonden dat het K-gehalte van de thrombocyten hoger is dan het Na-gehalte. Het K, Na en N gehalte van de thrombocyten werd door ons berekend als zijnde het verschil tussen de betreffende gehalten gevonden in thrombocytenrijk plasma en het plasma waaruit de thrombocyten afgecentrifugeerd waren. De gevonden waarden waren: K: 0, 26 mg per 10^{10} thrombocyten; Na: te weinig om nauwkeurig te bepalen. Zn en Fe. zijn in menselijke thrombocyten niet of nauwelijks aan te tonen (87, 126).

Veel is de laatste tijd bekend geworden over het serotonine.

Al het in het periphere bloed aanwezige serotonine is afkomstig van de thrombocyten. Het is in kristallijne vorm uit het serum geisoleerd. Het actieve deel hiervan is een eenvoudige chemische stof, het 5-hydroxytryptamine. Een overzicht over hetgeen wat tot 1954 bekend was over de aanwezigheid van deze stof in de thrombocyten heeft Bigelow (125) gegeven. Deze vond een verlaging van het serotonine in 6 van de 7 gevallen van thrombocythaemie. Hij achtte het mogelijk dat deze daling van het serotonine-gehalte de verhoogde bloedingsneiging verklaart bij thrombocythaemieën, waarbij verder geen enkele andere afwijking in het stollingsmechanisme gevonden wordt.

Door Weil Malherbe en Bone (220) is gevonden dat het grootste deel van het in het periphere bloed aanwezige adrenaline en nor-adrenaline van de thrombocyten afkomstig is, en zodra de cel begint te desintegreren hieruit vrij komt.

Hoofdstuk 3

ISOLATIEMETHODEN VAN DE LEUCOCYTEN

De laatste jaren zijn een aantal methoden uitgewerkt voor het isoleren van leucocyten, welke een grote vooruitgang betekenen bij de vroeger gebruikte meer primitieve technieken. Een goede isolatietechniek moet aan verschillende voorwaarden voldoen:

1. de leucocyten moeten voldoende zuiver afgescheiden zijn van de andere vormelementen,
2. de verschillende soorten leucocyten moeten in dezelfde verhouding aanwezig zijn als in het circulerende bloed,
3. de opbrengst moet voldoende zijn, dus gedurende de bewerking mag het verlies niet te groot zijn,
4. de leucocyten moeten zo min mogelijk beschadigd worden, mogen dus in eigenschappen zoals O_2 consumerend vermogen, phagocytose-activiteit en amoeboide beweeglijkheid niet te veel geleden hebben,
5. zij mogen niet irreversibel geklonterd zijn, maar moeten weer gemakkelijk geresuspendeerd kunnen worden. Hierdoor is het mogelijk, de bij het onderzoek te vinden waarden weer te geven per aantal cellen en niet per leucocytenvolume of drooggewicht.

Evenals bij de meeste vroegere methoden, wordt op een enkele uitzondering na, ook bij de nieuwere wijzen van isoleren gebruik gemaakt van het verschil in s. g. tussen de verschillende vormelementen van het bloed. Wanneer op een of andere wijze onstolbaar gemaakt bloed bij voldoende hoog toerental wordt afgecentrifugeerd, dan ontstaan drie lagen: de onderste bestaat uit erythrocyten, daarboven de buffy-coat bestaande uit de leucocyten met erop de thrombocyten, tenslotte het plasma. Dit verschil in gedrag van de vormelementen is een gevolg van de verschillen in s. g. Voor de erythrocyten wordt gerekend met een s. g. van 1,092, voor de leucocyten van 1,065 en voor de thrombocyten van 1,030. Het voor de leucocyten opgegeven getal betekent een te simpele voorstelling van zaken, daar de verschillende soorten leucocyten, zoals neutrophiele granulocyten, eosinophiele granulocyten, lymfocyten en monocyten onderling verschillende s. g. hebben.

Vroegere methoden van isoleren berustten veelal hierop,

dat men de bij centrifugeren verkregen buffy-coat afpipetteerde (126), of de erythrocyten onder deze buffy-coat wegzoog (127). Vooral bij ziektebeelden met veel leucocyten kon men voldoende leucocyten verkrijgen. Om de zuiverheid van de aldus verkregen leucocyten nog te verhogen heeft men veranderingen aangebracht in de centrifugebuizen: de leucocyten werden in een nauwer capillair gedeelte van de buis geconcentreerd (128). Bij dierproeven is veel gebruik gemaakt van een reeds in 1918 door De Haan beschreven methode (129); deze onderzoeker spoot nl. bij konijnen hypertonische zoutoplossing in de peritoneaalholte, verwijderde na enige tijd het exsudaat en kon dan de exsudaat-leucocyten isoleren.

Betrekkelijk weinig is gebruik gemaakt van de door Vallee e.a. beschreven methode (130), waarbij de leucocyten uit het bloed geisoleerd worden door de celbevolking door twee media te sedimenteren, nl. door plasma en door een isosmotische albumineoplossing met een s.g. dat ligt halverwege tussen dat van erythrocyten en leucocyten. Deze methode heeft verschillende bezwaren: het is niet zeker dat een volledige scheiding bereikt wordt en de leucocyten klonten samen, waardoor het niet mogelijk is ze te resuspenderen. Ook Spear heeft deze methode beschreven (50), bij gebruikte echter geen albumine maar gumacacia.

Op een heel ander principe berust de isolatiemethode beschreven door Li en Osgood (131), waarbij gebruik gemaakt wordt van een phytohaemagglutinin uit sojabonen, waardoor de erythrocyten tot ophoping gebracht worden en men na zeer korte tijd een plasma-suspensie van leucocyten overhoudt.

Veel opgang heeft een methode gemaakt, waarbij men door aan het bloed fibrinogeen toe te voegen een verhoogde bezinking van de erythrocyten verkrijgt. Zoals het eerst door Fahraeus (132) is beschreven versnelt fibrinogeen, indien het in de juiste hoeveelheid aan gehepariniseerd bloed wordt toegevoegd, de bezinking doordat het geldrolvorming van de erythrocyten veroorzaakt. Fibrinogeen is het voornaamste plasma-eiwit dat de suspensie-stabiliteit van de erythrocyten bepaalt. Minor en Burnett waren de eerste die hiervan gebruik maakten voor het isoleren van de leucocyten (133). Zij merkten nl. op, dat in het plasma dat boven de erythrocyten bleef staan een even sterke concentratie van leucocyten aanwezig was als in het capillaire bloed. Wat nu het principe van de methode betreft: zoals foor Fahraeus is uiteengezet, zijn de variabelen, betrokken bij de sedimentering van de erythrocyten, onderworpen aan de wet van Stokes; deze wet bepaalt de eindsnelheid (V), welke een bol in een oplossing van colloiden en electrolyten, zoals plasma is, zal bereiken, wanneer hij door dit vloeistofmedium vrij valt. De eindsnelheid V is dan gelijk aan: $\frac{2\ g\ a^2\ (d_1 - d_2)}{9\eta}$ waarin a is de radius van de bol, d_1 het s.g. van de bol, d_2 het s.g. van het vloeistofmedium, g. de versnel-

ling van de zwaartekracht en η de viscositeitscoëfficient van het vloeistofmedium.

Buckley, Powell en Gibson (134) hebben deze methode gestandaardiseerd en geschikt gemaakt voor het verwerken van grotere hoeveelheden bloed, Zij onderzochten, onder welke omstandigheden de onderlinge verhoudingen van de verschillende bij het proces betrokken factoren het gunstigst waren voor het verkrijgen van een zo volledig mogelijke scheiding van de leucocyten en erythrocyten en een zo groot mogelijke opbrengst aan leucocyten. Zij stelden vast, dat de eindconcentratie van fibrinogeen (waarbij rekening moet worden gehouden met het reeds in het bloed aanwezige fibrinogeen) in het mengsel van bloed en fibrinogeen moet liggen tussen 6, 2 en 6, 7 mg per ml. Wanneer deze hoger was, dan ontstond een irreversibele klontering, vermoedelijk doordat deze concentratie een beschadiging van de leucocyten tengevolge heeft. De gunstigste verhouding tussen erythrocytenvolume en vloeistofmedium bleek 0, 3 tot 0, 5 te zijn. De optimale temperatuur lag tussen 12° en 37° en de beste tijd voor afpipetteren van het bovenstaande plasma tussen 40 en 60 minuten. Het bleek dat afcentrifugeren ook bij laag toerental, nodig voor het afscheiden van de thrombocyten, reeds enige beschadiging van de leucocyten gaf, (o. a. verlies van phagocyterend vermogen). Van groot belang is dat door deze onderzoekers gebruik werd gemaakt van gesiliconiseerd glaswerk; door aanraking met onbehandeld glas worden leucocyten ernstig beschadigd, zoals blijkt uit verminderde amoeboide beweeglijkheid en verlies van phagocyterend vermogen (135). Reeds een enkele maal pipetteren met een ongesiliconiseerde pipet zou reeds de zuurstofconsumptie verminderen (136). Fibrinogeen geeft een versnelde bezinking, doordat het een lang asymmetrisch molecuul is; ieder lang asymmetrisch molecuul is even effectief (137). Zo kan men ook dextran gebruiken. Daar de snelheid van bezinken evenredig is met het mol. gew. van het sedimenterende agens, moet het dextran van een hoog mol. gew. zijn (24000 of hoger). Andere stoffen die in aanmerking komen zijn periston, dextrin, glutamylpeptide en gammaglobuline. De klontering, welke men bij het afcentrifugeren van de leucocyten uit het plasma soms kan zien ontstaan, zou men kunnen voorkomen door aan de suspensie-vloeistof acetaat (b. v. Na-acetaat) toe te voegen. Het acetaation heeft de tot nu toe onverklaarde eigenschap iedere vorm van klontering van leucocyten en thrombocyten tegen te gaan (137). Een volledige scheiding van erythrocyten en leucocyten kan men met de bovenbeschreven methode niet bereiken. Meestal wordt de verhouding erythrocyten/leucocyten 1 op 1; een enkele maal is de verhouding nog ongunstiger, vooral bij anemieën, waar veel jongere en dus lichtere erythrocyten aanwezig zijn. Opgegeven wordt (25) dat men door 2 x gedurende 3 minuten bij 800 toeren te centrifugeren het merendeel van de thrombocyten kwijt raakt. In gevallen met

een sterke thrombocytose zal het soms nodig zijn nog meer keren deze centrifugering te herhalen. Volgens Tullis (137) kan men de leucocyten na isolatie langere tijd in leven houden door ze bij 4° te bewaren in een phosphaatbuffer, waaraan NaCl en KCl toegevoegd zijn, de pH tussen 7 en 7, 4 te houden, als colloidaal bestanddeel voor de preserveervloeistof een 1% gelatineoplossing te nemen en vit. C en desoxyribonuclease en acetaat toe te voegen. Voor eenvoudige chemische bepalingen zal men gewoonlijk niet dergelijke maatregelen hoeven te nemen, maar met de bovenbeschreven methode uitkomen.

Verschillende apparaturen zijn beschreven, waardoor het mogelijk zou zijn om langs mechanische weg de verschillende vormelementen te scheiden (138, 139). De principes waarop zij berusten verschillen i. h. a. niet van de bovengenoemde.

Uit het bovenstaande blijkt wel, dat er verschillende manieren zijn waarop men leucocyten kan isoleren. Welke methode men zal gebruiken, zal naast de persoonlijke voorkeur samenhangen met het doel waarvoor men de te isoleren leucocyten nodig heeft en de hoeveelheid bloed die men wenst te verwerken.

Ook zijn verschillende methoden aangegeven voor verdere subfractionering van de verschillende soorten leucocyten (140, 141,142). Ook deze berusten uiteindelijk op het verschil in s.g. van de verschillende celtypen.

Hoofdstuk 4

ISOLATIEMETHODEN VAN DE THROMBOCYTEN

Veel van hetgeen gezegd is over het isoleren van leucocyten geldt ook voor het isoleren van thrombocyten. Ook hier berusten vrijwel alle methoden van isoleren op het verschil in s. g. en diameter tussen de thrombocyten en andere vormelementen van het bloed. De thrombocyten die het lichtst en dunst zijn, bezinken het laatst, zoals volgt uit de wet van Stokes. Niet alleen is gewerkt met de bij afcentrifugeren van bloed verkregen buffy-coat, zoals reeds in 1893 door Mosen beschreven is (143), maar ook met thrombocytenrijk plasma (144) verkregen door afcentrifugeren bij lagere snelheden.

Reeds meer dan een halve eeuw heeft het niet aan pogingen ontbroken om thrombocyten te isoleren. Toch waren tot voor enkele jaren de resultaten nog zeer onbevredigend, hoewel het veel grotere verschil in s. g. en diameter van de thrombocyten met de andere vormelementen van het bloed de isolatie in principe eenvoudiger maakt dan van de leucocyten. De bijmenging met andere vormelementen van het bloed en vooral de grote labiliteit van thrombocyten wanneer zij uit hun natuurlijk milieu verwijderd worden, vormden het grote probleem.

Een grote vooruitgang betekenden het gebruik van gesiliconiseerd glaswerk, waardoor de neiging tot agglutinatie en lysis sterk gereduceerd wordt, en de vervanging van de vroeger gebruikte anticoagulantia, zoals Na-citraat en oxalaat, door dinatrium-ethylenediaminetetraacetaat (sequestrene-Na) (149). Deze stof heeft de eigenschap zeer snel calcium te binden en reduceert de neiging tot lysis van de thrombocyten. Het agglutineren van de thrombocyten bij afcentrifugeren kan tegengegaan worden door Triton WR-1339 en Tween 80 (145); dit zijn niet-ioniserende, oppervlakte-actieve stoffen. Stefanini en Dameshek beschreven een isolatiemethode, waarbij alle bovenbeschreven verbeteringen toegepast worden (146).

Op een ander principe berust de isolatiemethode, welke door Freeman (147) beschreven is. Hij ontdekte bij toeval dat ionenuitwisselaars (Dowex 50 kralen) gebruikt voor het onstolbaar maken van bloed door het fixeren van calciumionen, tevens een gedeeltelijke verdwijning gaven van de thrombocyten, waarschijnlijk doordat calcium een binding aangaat met throm-

bocyten wanneer deze de bloedstroom verlaten (151). De thrombocyten kunnen daarna door uitwassen ten dele weer geëlueerd worden. Door andere voorbehandeling van de ionenuitwisselaar en door het gebruik van sequestrene-Na als uitspoelvloeistof heeft men de opbrengst aan thrombocyten aanzienlijk verbeterd (148). Toch blijft deze methode achter bij andere methoden, waarbij voor het isoleren gedifferentieerd centrifugeren toegepast wordt.

Door de bovenbeschreven verbeteringen in de isolatietechniek zijn alle problemen bij het isoleren van de thrombocyten niet opgelost. Door de bij het isoleren ondergane manipulaties en door de verandering van milieu kunnen de thrombocyten beschadigd zijn. Om dit vast te stellen beschikt men over criteria als de invloed op de stollingstijd, het normaliseren van de prothrombineconsumptie gedurende het stollen van thrombocytenarm plasma, het herstellen van de retractie van het stolsel van dit plasma en het zuurstof verbruik. Er ontbreekt echter een goed criterium om vast te stellen of geen lysis van de thrombocyten heeft plaats gevonden. Een dergelijk criterium bestaat voor de erythrocyten, waar het haemoglobine als hoofdbestanddeel van het opgeloste materiaal zich eenvoudig colorimetrisch bepalen laat. Van betekenis in dit opzicht zijn de onderzoekingen van Zajicek en Datta (116), die aantoonden dat bij lysis van thrombocyten in hypotonische oplossingen reeds een geleidelijke oplossing ontstond van thrombocytenmateriaal voordat de thrombocyten morphologisch veranderd waren. Zo bleek het pyrophosphatase, in de thrombocyten aanwezig, bij lysis bijna in zijn geheel in het lysaat over te gaan. Eigen waarnemingen van het zure phosphatase gaven dezelfde uitkomst. Onder gunstige omstandigheden, b. v. bij gebruik van een goed conserveermiddel (door Tullis (150) wordt hiervoor gelatine als zeer geschikt genoemd) en bij bewaren in een ijskast, behouden de thrombocyten zeer lang hun vermogen tot normaliseren van de stolling en prothrombineconsumptie. Zelfs na maanden zijn zij nog voor transfusiedoeleinden te gebruiken (146).

Hoofdstuk 5

ONDERZOEK NAAR DE BIOCHEMIE VAN DE LEUCOCYTEN

1. INLEIDING

Van de vele biochemische aspecten, die bij het onderzoek van de leucocyten naar voren gekomen zijn, hebben wij gemeend ons te moeten beperken tot de phosphataseactiviteit. Doel van het in dit hoofdstuk beschreven onderzoek was in de eerste plaats vast te stellen, in hoeverre de door Valentine en Beck gevonden waarden te reproduceren waren. In de tweede plaats werd nagegaan of zulke bepalingen ook van belang kunnen zijn bij de differentieel-diagnose van myeloide leukaemie, polycythaemia vera en myelofibrose met extramedullaire haematopoiese.

Phosphatasen zijn, zoals bekend is, in alle menselijke weefsels in wisselende hoeveelheden aanwezig. Het voorkomen hiervan in leucocyten is door Roche in 1931 voor het eerst aangetoond (151). Quantitatieve bepaling werd pas mogelijk door het werk van Rossiter (152), die aantoonde dat oppervlakte-actieve stoffen, zoals saponinen en galzuren, phosphatasen vrijmaken in de omgevende weefsels. Het alkalische en zure phosphatase is voor het eerst uitvoerig onderzocht door Cram en Rossiter (153) zowel met disodiumphenylphosphaat als met Na-alpha- en beta-glycerophosphaat als substraat. Zij vonden twee pH optima bij pH 5 en bij pH 9, 9. In dit opzicht zijn deze phosphatasen gelijk aan die in de weefsels. Mg is een activator, glycine alleen in lage concentratie; zink, cyanide en galzuren remmen.

De phosphatase activiteit van de leucocyten per g is van dezelfde orde als in de weefsels. Onder normale omstandigheden is de concentratie van het phosphatase in de leucocyten veel hoger dan in het plasma.

II. EXPERIMENTELE METHODEN

a. Isolatie van de leucocyten.

Voor het isoleren van de leucocyten wordt 20 cc bloed opge-

vangen in een gesiliconiseerde maatcylinder waarin 3 ml dextran + 2 ml van een 1% oplossing van sequestrene-Na in physiologisch zout. Men laat het bloed 20-30 minuten bij kamertemperatuur staan, waarna het bovenstaande plasma, waarin de leucocyten en thrombocyten, met een gesiliconiseerde pipet afgezogen wordt. Daarna wordt de suspensie 3 minuten bij 800 toeren per minuut in een gesiliconiseerde centrifugebuis afgecentrifugeerd. Na verwijdering van de bovenstaande vloeistof worden de leucocyten nogmaals afgecentrifugeerd en gewassen en het uiteindelijke leucocytenneerslag opgenomen in 5 ml physiologisch zout (indien slechts weinig leucocyten verkregen zijn in 2, 5 ml physiologisch zout). Het aantal leucocyten per mm^3 suspensie wordt in duplo geteld met geijkte pipetten. Tegelijk met bloedafname wordt het aantal leucocyten in het periphere bloed geteld en een uitstrijkje gemaakt, waarin 200 cellen gedifferentieerd worden.

b. Bepaling van de phosphatase-activiteit. In principe is de methode gebruikt zoals beschreven is door Valentine en Beck (25).

Als substraat voor het alkalische phosphatase wordt een oplossing van 1, 25 g Na-β-glycerophosphaat in 250 ml veronal-bufferoplossing (volgens Michaëlis) met een pH 9, 6 gebruikt. Voor het zure phosphatase een oplossing van 1, 25 g Na-β-glycerophosphaat in een veronal-bufferoplossing (volgens Michaëlis) met een pH 5, 4.

Voor de incubatie worden 8 gecalibreerde buizen gebruikt.
In buis 1, 2, 5 en 6 wordt 8, 8 ml substraatoplossing pH 9, 6 gepipetteerd.
In buis 3, 4, 7 en 8 wordt 8, 8 ml substraatoplossing pH 5, 4 gepipetteerd.
In buis 5, 6, 7 en 8 wordt 2 ml 30% trichloorazijnzuuroplossing gepipetteerd.
Vervolgens wordt aan elke buis toegevoegd:
0, 5 ml saponineoplossing (2% in phys. zout, vers bereid)
0, 2 ml $MgCl_2$ oplossing 0, 05 N
0, 5 of 0, 3 ml leucocytensuspensie (naar gelang de hoeveelheid die beschikbaar is)
Buis 1, 2, 3 en 4 worden gedurende 1 uur in een waterbad van 37° geincubeerd. Na de incubatie wordt toegevoegd 2 ml 30% trichloorazijnzuur.
Bepalingen en blanco's worden gefiltreerd nadat het eiwit voldoende uitgevlokt is door filters (Schleich en Schüll no. 602) 9 cm.

Bepaling van het vrijgekomen P na de inwerking der phosphatasen geschiedt volgens Fiske en Subbarow (154). De hiervoor nodige molybdeenzuuroplossing wordt bereid door 2, 5 g ammoniummolybdaat op te lossen in 100 ml 5 N H_2SO_4 (5 N = 21%); het reductiemiddel uit 1 aminonaphthol-sulfonzuur 159 mg, Na_2SO_3 opl. 20 %, 1, 5 ml op te lossen in 58, 5 ml oplos-

sing van 30 g Na-bisulfiet in 200 ml aq. dest. (In goed gesloten en geheel gevulde fles op koele plaats in het donker bewaard 2 weken houdbaar). Als standaardoplossing wordt gebruikt 0, 702 g KH_2PO_4 opgelost in 0, 1 N H_2SO_4 en aangevuld tot 1 liter. (0, 08 mg P per 5 ml).

Tabel I

PHOSPHATASEGEHALTE LEUCOCYTEN BIJ GEZONDEN

Naam	Datum	Leuc. per mm^3 suspensie	Gran.	Lymph.	Mon.	Alk. Phosph. in mg P vrijgemaakt per uur per 10^{10} leucocyten	Zure phosph. in mg P vrijgemaakt per uur per 10^{10} leucocyten
1 L. m.	8-10-54	2.450	68	27	5	51.9	45.7
2 "	25-10-54	8.050				41.8	22.8
3 J. m.	8-10-54	8.200	68	23	9	45.4	22.6
4 M. vr.	25- 9-54	12.800	84	12	4	37.5	-
5 "	10-10-54	5.050				47.8	35.8
6 G. m.	10-10-54	5.250	61	32	7	33.2	17.6
7 E. m.	13-10-54	13.100	66	32	2	23.9	22.9
8 Ha. vr.	15-10-54	14.600	76	21	3	52.1	22.7
9 Sm. m.	15-10-54	17.000				33.2	17.6
10 Te. vr.	21-10-54	10.350	50	48	2	35.9	23.0
11 Kw. m.	21-10-54	5.500	48	48	4	27.3	31.7
12 St. m.	17-12-52	15.050	49	43	8	35.4	26.6
13 Ho. m.	10-12-52	17.000	59	36	5	13.5	40.4
						Gem. ± s. d.: 36.8 ± 11.2	27.4 ± 8.9

III. EXPERIMENTELE RESULTATEN

De phosphataseactiviteit is weergegeven als mg P., vrijgemaakt per uur uit 10^{10} leucocyten. Hierdoor zijn duidelijk de grote verschillen in uitkomsten bij de diverse ziektebeelden te zien, ook al hebben de verschillende celsoorten er niet gelijk toe bijgedragen.

In tabel I zijn de gevonden waarden voor het alkalische- en zurephosphatasegehalte bij gezonden te vinden. Wij hebben gemeend hierbij ook te mogen rekenen 2 patienten St. en Ho. met resp. een ulcus bulbi en een hernia nuclei pulposi. De waarden voor het alkalische phosphatase varieren van 13, 5 tot 52, 1 per 10^{10} cellen (gem. 36, 8). Het zure phosphatase wisselt van 17, 6 tot 45, 7 (gem. 27, 4). De gevonden waarden verschillen slechts zeer weinig van die van Valentine en Beck.

In tabel II zijn te vinden de uitkomsten van de bepalingen bij een aantal patienten met polycythaemia vera. In alle gevallen was de diagnose gesteld op de afwijkingen in het bloed. Naast reeds lang bekende gevallen, die op verschillende wijze behandeld waren, zijn er hierbij ook waar de diagnose pas sinds kort gesteld was en nog geen enkele therapie toegepast was. De gevonden waarden variëren van 52 tot 255,2 (gem. 155) voor het alkalische phosphatase. Slechts één waarde ligt even onder de bovengrens van het normale (pat. Vi). Dit was een patient, van wie meer dan 20 jaar bekend was dat hij een poly-

cythaemia vera had; patient was sterk anaemisch. Op grond van de sterke basophilie in het periphere bloed werd aan een overgang in een chronische myeloide leukaemie gedacht. Bij obductie (die slechts gedeeltelijk mogelijk was) bleek in het beenmerg en de milt de granulopoiese sterk te overwegen terwijl erythropoiese vrijwel geheel ontbrak, maar het beeld was niet typisch leukaemisch.

Commentaar verdienen verder nog de gevonden waarden bij patient De. Bij deze patiente, van wie de haematologische gegevens te vinden zijn in figuur I, was in aansluiting aan een miltextirpatie een sterke blijvende verhoging van het aantal thrombocyten en leucocyten ontstaan. De stijging van de thrombocyten tot ongeveer 4000.000 per mm^3 had aanleiding gegeven tot het ontstaan van een ziektebeeld, dat in de literatuur beschreven is als thrombocythaemia haemorrhagica (155). Op klinische en haematologische gronden was hier reeds, ondanks het ontbreken van een verhoging van het aantal erythrocyten, de diagnose op polycythaemia vera gesteld. Haematologische en klinische verbetering van de toestand van de patiente na behandeling met P^{32} gaf hier geen verandering in het alkalische phosphatase van de leucocyten. Het valt verder op, dat er althans in deze gevallen geen correlatie bestaat tussen de duur van het ziektebeeld, veranderingen in morphologie of aantal van de leucocyten en het phosphatasegehalte. Zo is bij patient Ba. die nog nooit behandeld was en bij wie geen afwijking in de leucocyten gevonden was (zelfs was er geen relatieve granulocytose), het alkalische-phosphatasegehalte toch aanzienlijk verhoogd. Het zure phosphatasegehalte varieert tussen 21, 3 en 43, 5 (gem. 30, 8).

De uitslagen van 9 bepalingen bij 7 patienten met chronische myeloide leukaemie zijn te vinden in tabel III. Ook bij deze patienten stond de diagnose op grond van het haematologische en klinische beeld vast. De gevonden waarden voor het alkalische phosphatase zijn alle lager dan normaal en wisselen van 0 tot 11, 2 (gem. 4, 7). Er blijkt geen correlatie te zijn tussen de klinische toestand van de patient en de gevonden waarden. Patient Ba., met een alkalische phosphatase van O, was in een volledige klinische remissie onder behandeling met P^{32}. Bij patient He. en Du. is het alkalische phosphatase tijdens een rechute lager dan tijdens een remissie. Ook bij een nog niet behandeld en toevallig gediagnostiseerd subleukaemisch geval (Die.) zonder miltvergroting en met sterke vermeerdering van het aantal basophiele cellen is het gehalte laag. Het zure-phosphatasegehalte varieert van 12, 4 tot 52 (gem. 21, 9).

In 3 gevallen van myelofibrose werd ook nog de phosphataseactiviteit onderzocht (zie tabel IX). In 2 gevallen (Ha. en St.) was het alkalische phosphatase normaal (20 en 17). In een geval ligt het iets boven de door ons gevonden normale waarde, maar nog beneden die welke door Valentine en Beck opgegeven wordt. St. was een patient met een matige megalosplenie, een

TABEL II

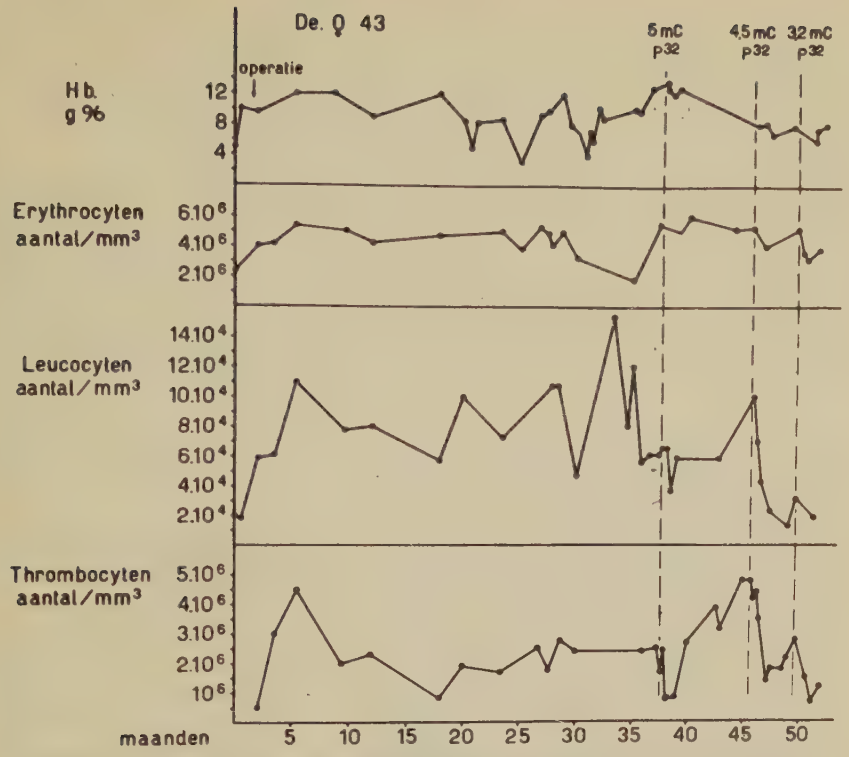
PHOSPHATASE-ACTIVITEIT VAN DE LEUCOCYTEN BIJ PATIENTEN MET POLYCYTHAEMIA VERA

Naam Datum	Aantal leuc. p. mm^3 capillair bloed	Differentieel telling						Alk. Phosph. in mg P gemaakt per uur per 10^{10} leucocyten	Zure Phosph. vrijgemaakt per uur per 10^{10} leucocyten	
		Myeloblasten	(Pro) (Meta) Myelocyten	Staven	Segm.	Lymfocyten	Monocyten			
1. Ta. m. 13/2'52	12000			3	89	6	2	95, 2	37, 4	Langdurig behandeld met aderlatingen. Erythrocyten voor behandeling 7.500.000.
2. Ga. m. 11/6'52	7600		0, 5	15	75	6	3, 5	147	30	Behandeld met röntgenbestraling. Erythrocyten 7.000.000.
3. Vi. m. 4/1'53	5550	1, 5	3, 5	13, 5	74	5, 5	1	52	31	Kort voor exitus, Erythrocyten 10 jaar tevoren 8.800.000.
4. Ba. m. 25/6'53	4950			7	62, 5	26	4, 5	115	25	Onbehandeld. Erythrocyten 7.300.000.
5. Ha. m. 4/10'51	11000			7, 5	77	13, 5	2	254, 8	21, 3	Onbehandeld. Erythrocyten 7.600.000.
6. De. v. 4/10'51	81000	1, 5	2	13, 5	76	3, 5	3, 5	91, 1	26, 4	Onbehandeld. Anaemie. Met Fe therapie erythrocyten soms tot 6.000.000.
7. De. v. 22/2'52	60000			9	86	2	2	137, 7	43, 5	Na P^{32}.
8. Re. v. 30/3'54	10400	0	0	2, 5	80	11, 5	5, 5	255, 2	27, 8	Onbehandeld. Sinds kort gediagnosticeerd. Erythrocyten 8.000.000.
9. Pe. v. 15/10'54	11300	0	0	0	82	15	3	251, 1	----	Langdurig behandeld met aderlatingen en P^{32}. Erythrocyten voor behandeling 7.000.000.
10. Br. m. 7/11'54	11300	0	0	3	70	24	3	150, 1	----	Behandeld met aderlatingen en P^{32}. Erythrocyten voor behandeling 9.400.000.
Gem. $\pm$ s. d.:								155 $\pm$ 74.4	30.8 $\pm$ 6.7	

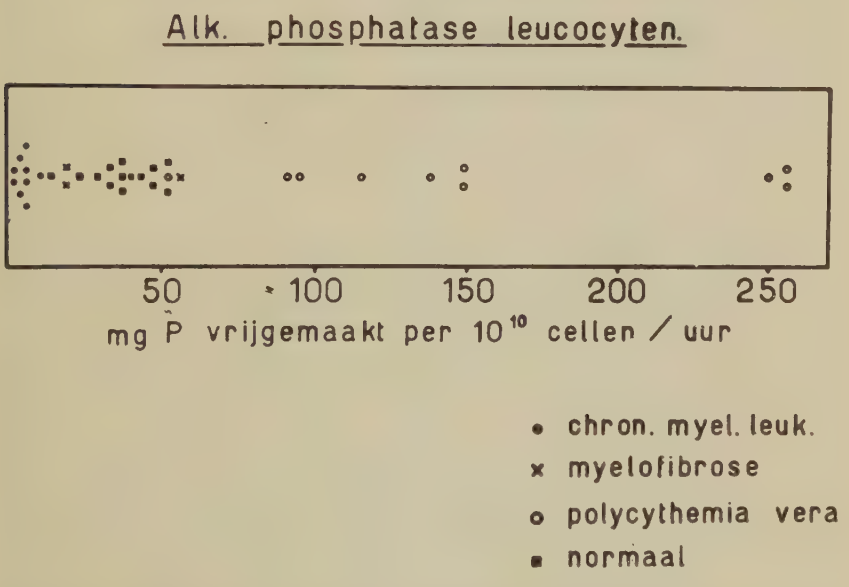
TABEL III

PHOSPHATASE-ACTIVITEIT VAN DE LEUCOCYTEN BIJ PATIENTEN MET CHRONISCHE MYELOIDE LEUKAEMIE

Naam Datum	Aantal leuc. p. mm^3 capillair bloed	Differentieel telling: Myeloblasten	(Pro) (Meta) Myelocyten	Staven	Segm.	Lymfocyten	Monocyten	Alk. Phosph. in mg P vrijgemaakt per 10^{10} leucocyten per uur	Zure Phosph. vrijgemaakt per 10^{10} leucocyten per uur	Opmerkingen
1. He. m.										
27/11'51	8050	0	0, 5	7	84, 5	4, 5	3, 5	6, 9	12, 4	Na miltbestraling.
15/7'52	10700	3	1, 5	3, 5	82, 5	8	1, 5	1, 8	28	Klinische rechute.
2. v. d. He. m.										
12/9'52	100000	2	33, 5	23, 5	39	2	0, 5	2, 3	32, 4	Miltbestraling. Röntgenbestraling en urethaan.
3. v. O. m.										
3/12'51	10400	19	0, 5	5, 5	56, 5	16, 5	3	11, 2	25, 6	Aplastische anaemie.
4. Du. v.										
19/3'52	26350	7	18	12, 5	60, 5	1, 5	0, 5	6, 1	24, 6	Miltbestraling.
25/6'52	18480	6, 5	30, 5	8, 5	50, 5	3	1	2, 5	26	Hoge temperatuur, anaemie, thrombopenie. Kort voor terminale myeloblasten crisis.
5. Die. m.										
16/7'52	14500	2	6, 5	1, 5	78	7	5	5, 1	52	Onbehandeld.
6. Ba. v.										
7/10'53	11500		1		79, 5	16	3, 5	0	----	In remissie. Sinds 1 jaar behandeld met P^{32}.
7. v. d. B. m										
3/11'54	120000	0, 5	7	13, 5	58, 5	4, 5	6	6, 6	17, 9	Chronisch contact met benzol, miltbestraling.
								Gem. $\pm$ s. d.: 4.7 $\pm$ 3.3.	27.4 $\pm$ 11.6	



Figuur 1. Haematologische gegevens van patiente De.



Figuur 2. Alkalische phosphatasegehalte van de leucocyten bij gezonden en patienten met myeloproliferatieve syndromen

TABEL IV

PHOSPHATASE-ACTIVITEIT VAN DE LEUCOCYTEN BIJ PATIENTEN MET MYELOFIBROSE EN ANDERE HAEMATOLOGISCHE AANDOENINGEN

Naam Datum	Aantal leuc. p. mm^3 capillair bloed	Myelo-blasten	(Pro) (Meta) Myelo-cyten	Staven	Poly-nucl. leuc.	Lymfo-cyten	Mono-cyten	Alk. Phosph. in mg P gemaakt per 10^{10} leuco-cyten	Zure Phosph. vrijge-maakt per uur	Opmerkingen
1. St. v. 10/12'51	11520	3	16	16, 5	45, 5	17, 5	1, 5	17, 7	37	Myelofibrose
2. Pe. v. 19/1'53	8000		22, 5	16, 5	42	18	1	55	18	Myelofibrose
3. Hau. v. 4/6'53	14300	3	4	27	39	17	10	20	45	Thrombocytose, recidiverende thrombosen.
4. Bl. m. 14/2'52	2800	0	0	0	8	59	33	2, 4	5, 8	Paramyeloblasten leukaemie.
5. To. m. 8/8'52	110000	0	0	0	2	97, 5	0, 5	0, 8	4	Chronische lymfatische leukaemie.
6. Mo. m. 15/11'52	3890	0	0	0	69	21	10	16, 4	10	Ziekte van Hodgkin.
7. End. v. 3/6'52	13950	23, 5	11	1, 5	32	29, 5	2, 5	52	18	Acute myeloide leukaemie, tijdens ACTH behandeling.
8. Pr. v. 14/3'52	88600	95	0	0, 5	3, 75	0, 75	0	3, 2	2, 5	Paramyeloblasten leukaemie.
9. Boll. v. 25/11'51	3400			7	52	37	3	15, 5	6	Normochrome anaemie.
10. Bras. v. 2/12'53	7200			0, 5	71, 5	23	4	24, 2	44, 7	Hypochrome anaemie.
11. Mo. v. 26/11'53	4300		0, 5	1	61, 5	35	2	22, 7	26	Pernicieuze anaemie.

röntgenologisch zeer duidelijke myelofibrose en een reeds jaren lang weinig veranderend bloedbeeld met een matige hoeveelheid onrijpe cellen van het witte en rode systeem. Evenals bij patient Pe. was de diagnose bevestigd door een botbiopsie. Bij patient Hau. waren alle beenmergpuncties, zowel in het sternum als in de crista iliaca, steeds mislukt. Lever- en miltpunctie toonden het bestaan van een extramedullaire haematopoiese aan, waarbij vooral het grote aantal megacaryocyten opviel. In het periphere bloed was een matige leucocytose met onrijpe cellen en een sterke thrombocytose. Het klinische beeld werd beheerst door telkens recidiverende thrombosen en embolieën. De uitkomsten van de alkalische-phosphatasebepalingen bij polycythaemia vera, chronische myeloide leukaemie, myelofibrose en normalen zijn nog eens weergegeven in fig. 2.

In tabel IV zijn tevens weergegeven de resultaten bij enkele leukaemiepatienten. In 2 gevallen van paramyeloblastenleukaemie en een chronische lymfatische leukaemie is de waarde zowel van het alkalische als van het zure phosphatase laag. Bij een patient met een acute myeloide leukaemie is tijdens een zeer korte remissie na ACTH het alkalische phosphatase normaal. Dit bevestigt de waarneming van Valentine en Beck, die ook in een geval van acute myeloide leukaemie onder ACTH behandeling een aanvankelijk verlaagd phosphatasegehalte normaal zagen worden (26).

In tabel V zijn nog te vinden de resultaten van enige onderzoekingen bij andere ziektebeelden. Bij patient St. met een zeer ernstige miliaire t.b.c. en ontbrekende granulocytose, die korte tijd later overleed, is het phosphatasegehalte weliswaar wat verhoogd, maar voor een patient met een zo ernstige infectie is dit een lage waarde. Ook Valentine en Beck vonden in enige gevallen met overweldigende infectie slechts een betrekkelijk geringe stijging van het alkalische phosphatase (25). Laag is het alkalische-phosphatasegehalte bij een onbehandeld geval van de ziekte van Addison. Een dergelijke lage waarde zou volgens een latere publicatie van Valentine en Beck bij uitzondering ook bij normalen gevonden kunnen worden (28). Patient V. K. die in de anamnese een Smithwick-operatie had, was lijdende aan een hepatosplenomegalie met thrombocytose en leucocytose. De diagnostiek van deze aandoening werd bemoeilijkt doordat patient een bloedingsneiging vertoonde. Het normale alkalische phosphatase pleit tegen een chronische myeloide leukaemie en tegen een polycythaemia vera als oorzaak van deze afwijkingen.

Ter contrôle van de methode werden nog enkele onderzoekingen verricht, waarbij werd nagegaan of de gevonden verschillen in phosphatase-activiteit werkelijk op een verhoogd of verlaagd phosphatasegehalte van de cellen berustten. Men zou zich kunnen voorstellen, dat de lage, bij chronische myeloide leukaemie gevonden waarden een gevolg zijn van een in de leu-

TABEL V

PHOSPHATASE-ACTIVITEIT VAN DE LEUCOCYTEN BIJ VERSCHILLENDE ZIEKTEN

Naam en Datum	Aantal leuc. p. mm^3 cap. bloed	Granulo-cyten	Lympho-cyten	Mono-cyten	Alkal. Phosph. in mg P vrijgemaakt per 10^{10} leucocyten per uur	Zure Phosph.	Opmerkingen
1. Je. m. 20/2'52	4.350	70	23	7	41.4	45.7	Prostaatcarcinoom Botmetastasen.
2. Sch. m. 13/3'52	3.200	60	28	12	60.1	20.2	Miliair t. b. c.
3. Re. v. 12/9'52	9.300	56	36	7	9	19	M. Addison, voor behandeling met cortison.
4. Ball. m. 4/11'54	7.000	60	36	4	40.7		M. Addison. Bronchuscarcinoom met bijniermetastasen. Behandeld met cortison.
5. deJ. v. 3/11'54	11.200	81	17	2	49.7		M. Cushing.
6. Gee. m. 22/12'53	4.100	60	34	6	25.5		t. b. c. pulmonum. chronisch rheuma.
7. K. m. 18/2'55	20.300	79	17	4	17.8		Ziekte v. Buerger, hypertensie, hepatosplenomegalie, thrombocytose, leucocytose, bloedingsneiging.

cocyten aanwezige remstof, de verhoogde waarden bij polycythaemia vera van een in de leucocyten aanwezige activator. Hieronder volgen de resultaten van enkele contrôleproeven:

a Herhaalde bepalingen van het alkalische- en zure-phosphatasegehalte op verschillende dagen bij telkens dezelfde personen. In 2 gevallen (zie tabel I, proef 1, 2, 4 en 5) werden vrij aanzienlijke verschillen gevonden, die echter niet groter waren dan die welke Valentine en Beck bij gezonden waarnamen.

b Herhaalde bepalingen van het phosphatasegehalte met een tussenpoos van enige dagen uit dezelfde leucocytensuspensie. Dit onderzoek leverde enige moeilijkheden op, doordat bij de latere bepalingen de leucocyten zich soms moeilijk lieten resuspenderen tengevolge van klontering. Zo gaf herhaling van proef 6, tabel I, een lagere uitkomst voor het alkalische phosphatase, te zien nl. 19, 5 (26, 8). Het zure phosphatasegehalte van de leucocytensuspensie van proef 5 bedroeg enige dagen later 29, 8 (35, 5). Daar de oorzaak hiervan beschadiging van de leucocyten zou kunnen zijn, omdat uit dezelfde suspensie herhaalde malen met een ongesiliconiseerde pipet opgezogen was, werd deze proef nogmaals herhaald. Nu echter werd de te onderzoeken suspensie dadelijk in twee gelijke helften verdeeld en in afzonderlijke buizen bewaard. Voor de latere bepaling werden dus leucocyten gebruikt, die nog niet door contact met een ongesiliconiseerde pipet beschadigd waren. Thans deden zich geen moeilijkheden bij het resuspenderen voor en werden bij herhaling van proef 2, tabel I, nagenoeg gelijke uitkomsten verkregen: alkalische phosphatase 41, 7 resp. 41, 8 en zure phosphatase 23, 1 resp. 22, 8.

c Onderzoek naar de aanwezigheid van een remstof voor het alkalische phosphatase in de leucocyten van patienten met chronische myeloide leukaemie. Hiervoor werd het alkalische-phosphatasegehalte bepaald van een suspensie van normale- en van leukaemische leucocyten en tenslotte nog van een suspensie gemaakt uit de halve hoeveelheden van beide. De bij de laatste bepaling te vinden waarde zou bij afwezigheid van een dergelijke remstof gelijk moeten zijn aan de helft van de som van de beide andere. De gevonden waarden waren:

experiment 1: normale 0, 004 mg P; chron. myel. leuk.: 0, 0105 mg P; $\frac{1}{2}$ normaal + $\frac{1}{2}$ chron. myel. leuk. 0, 0084 mg P.

experiment 2: normale 0, 030 mg P; chron. myel. leuk.: 0, 001 mg P; $\frac{1}{2}$ normale + $\frac{1}{2}$ chron. myel. leuk. 0, 015 mg P.

Een remstof kon dus niet worden aangetoond.

d Onderzoek naar een mogelijke activator voor het alkalische phosphatase in de leucocyten bij polycythaemia vera. Dit onderzoek werd op dezelfde wijze verricht als het vorige.

De uitkomsten waren:
0, 3 cc van een suspensie van een normale: 0, 010 mg P;
0, 3 cc van een suspensie van een polycythaemie: 0,009 mg P;
0, 25 cc normale met 0, 25 cc polycythaemie: 0, 014 mg P.
Herhaling van deze proef met twee andere personen gaf:
0, 3 cc normale 0, 0046 mg P; 0, 3 cc polycythaemie: 0, 012 mg P;
0, 3 cc normale met 0, 2 cc polycythaemie 0, 011 mg P. Dit pleit dus tegen de aanwezigheid van een speciale activator in de leucocyten bij polycythaemia vera.
Terugvinden van een aan een bepaling toegevoegde, bekende hoeveelheid alkalische phosphatase. In de literatuur wordt opgegeven, dat men bij gebrek aan een alkalische phosphatase preparaat van voldoende zuiverheid het beste gebruik kan maken van menselijk serum met een bekend phosphatasegehalte (70). Daarom werden naast elkaar bepaald een leucocytensuspensie, serum van een patient en een mengsel van beide. De uitslag was:
0, 5 cc leucocytensuspensie: 0, 005 mg P; 0, 5 cc plasma: 0, 090 mg P;
0, 25 cc plasma met 0, 25 cc leucocytensuspensie: 0, 053 mg P. Het toegevoegde phosphatase kon dus weer volledig teruggevonden worden.

IV. BESPREKING VAN DE RESULTATEN

De experimentele resultaten komen in principe overeen met die van Valentine en Beck, alleen is bij de door ons onderzochte gevallen van polycythaemia vera de waarde van het alkalische phosphatase gem. tweemaal zo hoog. De oorzaak hiervan zou kunnen zijn, dat van de 15 door Valentine en Beck onderzochte patienten geen nog niet en slechts enkele sinds kort onder behandeling waren. Ook namen zij alleen patienten met duidelijke afwijkingen in morphologie of aantal van de leucocyten. Enkele van de hoogste door ons gevonden waarden, kwamen juist voor bij een tweetal patienten (Ba. en Re.) bij wie de ziekte pas gediagnostiseerd was en afwijkingen in morphologie en aantal van de leucocyten ontbraken. De door ons gevonden waarden bij chronische myeloide leukaemie zijn alle lager dan normaal.
In tegenstelling met Valentine en Beck, die bij polycythaemia vera en chronische myeloide leukaemie gemiddeld een wat hoger zure phosphatasegehalte vonden dan bij gezonden, waren de gemiddelde waarden bij ons niet verschillend. Dit zou als volgt verklaard kunnen worden. Zoals blijkt uit de onderzoekingen beschreven in hoofdstuk 6, wordt met saponine een zure phosphatase uit de thrombocyten vrijgemaakt. Bij chronische myeloide leukaemie en polycythaemia vera is vaak het aantal thrombocyten verhoogd. In deze gevallen is tweemaal centrifugeren bij 800 toeren per minuut niet genoeg om de

thrombocyten kwijt te raken. In dergelijke gevallen moet nog een of tweemaal gecentrifugeerd worden. Bij een normaal aantal thrombocyten vonden wij enkele malen bij contrôle in de leucocytensuspensie na tweemaal centrifugeren nog 50,000 thrombocyten mm^3. Een bijmenging van 100.000 thrombocyten mm^3 bij een suspensie die 10.000 leucocyten per mm^3 bevat zal reeds een stijging van het zure phosphatasegehalte van omstreeks 15% kunnen geven.

De door ons gevonden waarden bij 3 gevallen van myelofibrose waren normaal. Valentine en Beck vonden bij dit ziektebeeld naast normale ook verlaagde en verhoogde waarden.

Voor de diagnostiek zullen bepalingen van het alkalische phosphatasegehalte slechts in zeldzame gevallen nodig zijn, daar meestal de diagnose op grond van de gebruikelijke criteria wel te stellen is. Bij onze gevallen was alleen bij polycythaemie-patienten Vi. en De. de bepaling van diagnostische betekenis. Misschien kan zij ook van nut zijn voor de differentieel diagnose tussen polycythaemia vera en secundaire polycythaemie. Over de functie van het alkalische phosphatase is niets bekend.

V. PHOSPHATASEBEPALINGEN IN DE CELLEN VAN HET BEENMERG

Om verschillende redenen zal quantitatief biochemisch onderzoek van de beenmergcellen een aanvulling kunnen zijn op het onderzoek van de leucocyten in het periphere bloed. In de eerste plaats zou het indien men er vanuit gaat dat ziektebeelden als polycythaemia vera en chronische myeloide leukaemie in wezen panmyelosen zijn de moeite waard zijn te weten of afwijkingen als in de leucocyten ook in de kernhoudende cellen van het erythropoietische en thrombopoietische systeem kunnen voorkomen, ook al geven de niet kernhoudende eindstadia van de erythropoiese en thrombopoiese niet dezelfde biochemische veranderingen te zien als de leucocyten in het periphere bloed. Gelijktijdige bepalingen van het phosphatasegehalte in de cellen van het periphere bloed en van het beenmerg zullen hierover wellicht opheldering kunnen geven.

In de tweede plaats wordt quantitatieve bepalingen bij biochemisch onderzoek van de leucocyten mogelijk in gevallen waar onvoldoende leucocyten in het periphere bloed aanwezig zijn, zoals bij agranulocytose, granulopenie t. g. v. hypersplenie of pernicieuze anaemie.

Om deze redenen werd in enkele gevallen ook het phosphatasegehalte van de beenmergcellen onderzocht bij patienten met een granulopenie en werden de bevindingen bij bepalingen van het phosphatasegehalte in de cellen van het periphere bloed in enige gevallen vergeleken met die van de cellen van het beenmerg.

De door ons gevolgde methode was als volgt:

TABEL VI

PHOSPHATASEACTIVITEIT IN DE CELLEN VAN HET BEENMERG

Naam Datum	Aantal kernhoudende cellen per cu mm suspensie:	Myeloblasten:	Myelocyten	Staven	Segm. k.leuc.	Normo- en Pronormoblasten:	Lymphocyten:	Plasmacellen in mg P vrijgemaakt per uur per 10^{10} leuc.	Alk. Ph.	Zure Ph. per 10^{10} leuc.:	Opmerkingen
1 Die. m. 16-7-52	2.400	18	41	14	16	10	0	0	3.8	88	Chron. Myel. Leuk.
2 Bart. v. 7-8-52	8.750	2,5	29	11	25	16	17	0.5	11	27	Levercirrhose.
3 Bo. v. 2-8-52	8.700	0.5	41.5	3	2.5	46	3	3	99	30	Hyperchrome anaemie. Leucopenie, levercirrhose, ontsteking coecum.
4 Den. v. 23-7-52	9.150	18	30	25	19.5	7.5	0	0	19	22	Hypersplenie.
5 Bol. v.	20.850	1	22.5	15	10.5	50	0.5	1	16	-	Anaemie e. c. i.
6 Veracht. v. 20-11-53	2.500		20	8	16.4	53.6	0.8	1.2	32.9	55.7	Pernicieuze anaemie. Onbehandeld.
7. Mo. v.	8.540	0.25	21.5	9.5	18.6	49.25,	0.75	0.25	31	23.5	Pernicieuze anaemie. Onbehandeld.
8 Bras. v. 2-12-53	18.100	0	23.2	21.2	27.6	27.2	0.4	0.4	17.2	18.3	Hypochrome anaemie.
9 Haz. m. 14-12-53	8.700	0	27.2	14	17.2	31.2	0	6.9	82.6	24.9	Pol. vera Behandeld met P^{32}.
10 Gee. m. 22-12-53	11.600	1	36	16	11.5	32.5	1.5	1.5	25.5	16.5	t. b. c. pulmonum. Chronisch rheuma.

Uit 1-2 cc door sternaalpunctie verkregen bloed worden op dezelfde wijze als dit voor de leucocyten van het periphere bloed beschreven is, de leucocyten geisoleerd en een suspensie van beenmergcellen bereid. Van het sternaalbloed wordt ook een uitstrijk gemaakt, waarin minstens 250 cellen geteld worden. Hoewel bij de proef aanzienlijke hoeveelheden normoblasten en pronormoblasten in de suspensie aanwezig zijn, blijkt toch dat waarschijnlijk t. g. v. hun groter s. g. het verlies aan deze cellen bij het bereiden van de suspensie groter is dan dat aan granulocyten. De resultaten van dit onderzoek zijn weergegeven in tabel VI. Zij komen ongeveer overeen met die in het periphere bloed. Het alkalische phosphatase is laag bij patient Die. (chronische myeloide leukaemie), hoog bij patient Haz. (polycythaemia vera), echter veel lager dan in het periphere bloed (zie bepaling 5 tabel II). Of dit een gevolg is van de grotere onrijpheid van de leucocyten of van het ontbreken van alkalische phosphatase in de normoblasten is niet duidelijk. De resultaten van proef 5, 7, 8, 9 en 10 vergeleken met die van tabel IV 9, 10, 11; tabel II 5 en tabel V 7 maken het bestaan van een hoge alkalische phosphatase-activiteit in de normo- en pronormoblasten niet waarschijnlijk.

Hoofdstuk 6

ONDERZOEK NAAR DE BIOCHEMIE VAN THROMBOCYTEN

1. INLEIDING

De veranderingen in phosphatase-activiteit in de leucocyten (zie vorige hoofdstuk), welke bij een aantal ziektebeelden werden waargenomen, deed de vraag rijzen of ook in de thrombocyten phosphatase-activiteit aangetoond kan worden, en zo ja, of deze activiteit bij verschillende ziektebeelden varieert. Bij de aanvang van ons onderzoek was nog niets bekend omtrent eventuele phosphatase-activiteit in de thrombocyten. Sindsdien is uit het onderzoek van Salvidio en Alexander (114, 115) gebleken, dat dit enzym inderdaad in deze cellen aanwezig is.

Voorts hebben wij getracht na te gaan of in de thrombocyten al dan niet kernsubstantie aanwezig is. Hieromtrent zijn in de literatuur zeer tegenstrijdige gegevens te vinden (zie hoofdstuk 2). In tegenstelling met de mening van vele vroegere onderzoekers is men tegenwoordig steeds meer geneigd de aanwezigheid van kernsubstantie in de thrombocyten te ontkennen. De vraag is echter gerezen (87) of de gebruikte methoden voldoende gevoelig zijn om een kleine hoeveelheid desoxyribonucleinezuur (DNA) in de thrombocyten aan te tonen. Tot nu toe is nog geen onderzoek ingesteld naar de aanwezigheid van een dergelijke fractie met behulp van P^{32}. Bij de leucocyten heeft men, door de snelheid van inbouw van P^{32} in het desoxyribonucleinezuur te bepalen, gegevens kunnen verzamelen over hun levensduur. Dit was mogelijk, omdat P^{32} in het DNA-molecuul alleen kan worden ingebouwd, indien een cel in mitose is (173). De celdeling is een zeer gevoelig proces en de synthese van DNA wordt beschouwd als een van de meest gevoelige criteria voor de mitotische activiteit. Indien DNA ook aanwezig is in de thrombocyten, zou inbouw van P^{32} in deze fractie een bruikbare methode kunnen zijn om de thrombocyten te merken. Daarom werd hiernaar een onderzoek ingesteld.

II. EXPERIMENTELE METHODEN

a. Isolatie van de thrombocyten

De bij het isoleren gebruikte techniek is niet steeds dezelfde

geweest. Geleidelijk zijn wijzigingen aangebracht. De hieronder beschreven methode is tenslotte het meest bruikbaar gebleken.

Bloedafneming geschiedt door venapunctie met gesiliconiseerde naalden met een voldoende breed lumen om het afnemen snel te laten verlopen. Het bloed wordt via een aan de naald bevestigd plastic slangetje opgevangen in een gesiliconiseerde met ijs gekoelde maatcylinder, die als anticoagulans een 1%-oplossing van sequestrene-Na in physiologisch zout bevat. Gestreefd wordt naar een verhouding anticoagulans: bloed = 1 : 9.

Om de thrombocyten van de andere vormelementen te scheiden wordt het bloed zo snel mogelijk na het afnemen over enige met ijs gekoelde centrifugebuisjes verdeeld en daarna gedurende 10 minuten met een snelheid van 1500 toeren per minuut afgecentrifugeerd in een groot model Homef-centrifuge. Deze heeft een lange uitlooptijd, waardoor er minder kans is dat bij het tot stilstand komen reeds afgecentrifugeerde erythrocyten en leucocyten opgewerveld worden. Het bovenstaande plasma, waarin zich de thrombocyten bevinden, wordt met behulp van een gesiliconiseerd Pasteurspipetje met rubber zuignapje afgezogen tot ongeveer 1 cm van het scheidingsvlak met de afgecentrifugeerde celmassa. Ter voorkoming van opwervelen dient dit zeer voorzichtig te geschieden. Bij enkele gevallen met een zeer hoog thrombocyten-getal moet langer dan 10 minuten afgecentrifugeerd worden om een voldoende scheiding te krijgen. Het verkregen plasma met thrombocyten bevat vaak zo weinig bijmenging aan erythrocyten en leucocyten, dat verdere zuivering niet noodzakelijk is. Indien de bijmenging bij contrôle onder de microscoop nog te groot is voor het te verrichten onderzoek wordt het plasma nog eens gecentrifugeerd gedurende 15 minuten bij 2000 toeren. Het grootste deel van een nog aanwezige bijmenging bevindt zich dan in de punt van de centrifugebuis (waar de erythrocytenbijmenging als een rode laag te zien is), met hier bovenop een deel van de thrombocyten dat reeds afgecentrifugeerd is. Met behulp van het pipetje worden deze in het plasma geresuspendeerd, waarbij er zorgvuldig voor gewaakt moet worden de onderste erythrocytenlaag niet op te wervelen. De verkregen suspensie van thrombocyten wordt afgepipetteerd. Wil men een nog grotere graad van zuiverheid bereiken, dan moet men deze bewerking herhalen Het plasma wordt verzameld in een maatcylinder en de thrombocyten hierin met een pipetje homogeen gesuspendeerd. In een klein monster hiervan wordt het aantal thrombocyten per mm^3 plasma en de eventueel nog aanwezige bijmenging bepaald. De suspensie wordt al naar de te verrichten onderzoekingen nauwkeurig met maatpipetten over verschillende centrifugebuisjes verdeeld. Teneinde de thrombocyten uit het plasma af te zonderen wordt met 4000 toeren per minuut gedurende minstens een half uur afgecentrifugeerd. Het bovenstaande plasma is dan volkomen helder en wordt afgeschon-

ken. Het bevat geen thrombocyten meer, zoals ons gebleken is uit contrôleproeven waarbij het nog eens gedurende 15 minuten met 18000 toeren per minuut werd afgecentrifugeerd. Om de laatste plasmaresten te verwijderen wordt de thrombocytenknoop nog driemaal met physiologysch zout gedurende 15 minuten bij 4000 toeren afgecentrifugeerd. Na afschenken van het physiologisch zout worden de verschillende porties thrombocyten in de ijskast bewaard of onmiddellijk voor bepalingen gebruikt.

Op verschillende wijzen kan men de opbrengst aan thrombocyten uit hetzelfde volume bloed nog vergroten. Van de achtergebleven thrombocyten bevinden de meeste zich in het bovenste derde deel van de afgecentrifugeerde celmassa. Dit bovenste derde deel wordt samen met het er nog bovenstaande plasmalaagje uit de verschillende centrifugebuisjes verzameld in een andere centrifugebuis en bij 1500 toeren gedurende 10 minuten gecentrifugeerd. Op deze wijze krijgt men opnieuw een hoeveelheid thrombocytenplasma, dat op dezelfde wijze als boven beschreven is verder verwerkt kan worden. Ongeveer 65% van de oorspronkelijke in het bloed aanwezige thrombocyten zijn dan geisoleerd. Deze opbrengst komt volgens enkele vergelijkende proeven, ook wat de bijmenging betreft, overeen met de opbrengst die men krijgt indien men de door Minor en Burnett beschreven methode gebruikt (145). Wil men de opbrengst nog verder verhogen, dan kan men het bij afcentrifugeren verkregen thrombocytenvrije plasma weer brengen bij de achtergebleven resten van het bloed en hieruit op dezelfde wijze als uit het verse bloed na resuspenderen en gedifferentieerd centrifugeren thrombocytenrijk plasma isoleren. Op deze manier kan zelfs 90% van de thrombocyten geisoleerd worden.

b. Telling van de thrombocyten

Telling van het aantal thrombocyten is door ons steeds voor elke serie bepalingen verricht met 2 geijkte leucocytenpipetten. Als telvloeistof is een 3,8% Na-citraatoplossing gebruikt, die elke dag ververst is ter voorkoming van een hoge blanco van de telvloeistof. Tegelijk is de bijmenging gecontroleerd door in de hele telkamer het aantal leucocyten en erythrocyten te tellen. De bepaling van de bijmenging kan nog nauwkeuriger geschieden, door in een leucocytenpipet eerst geconcentreerde oplossing van Türck op te zuigen tot 1 en daarna de suspensie tot 11 (door dus dezelfde methode te gebruiken als bij het tellen van de cellen in het lumbaalvocht). Doordat de suspensie nagenoeg niet verdund wordt, kunnen in één telkamer veel meer erythrocyten en leucocyten geteld worden.

Bij de beoordeling welke invloed een bijmenging aan erythrocyten en leucocyten op de uitkomsten van een bepaling zal hebben, is niet alleen het aantal erythrocyten en leucocyten per mm^3 van de suspensie van betekenis, maar meer nog het aantal thrombocyten per mm^3 suspensie. Dit laat zich op de

volgende wijze illustreren: Stel dat het stikstofgehalte van thrombocyten wordt bestudeerd, dan kunnen door bijmenging van erythrocyten en leucocyten belangrijke fouten worden gemaakt. Nemen wij aan dat:

10^{10} thrombocyten bevatten 2,0 mg N.
10^{10} leucocyten ,, 120 mg N.
10^{10} erythrocyten ,, 40 mg N.

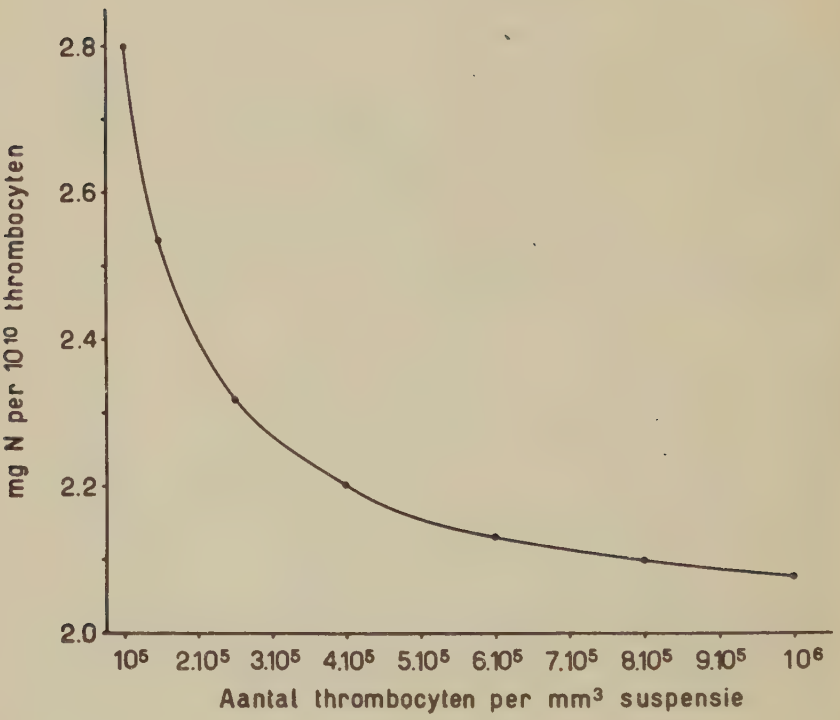
Veronderstellen wij, dat wij verschillende suspensies hebben, alle met een constante bijmenging van p erythrocyten en q leucocyten per mm^3, maar waarvan het aantal thrombocyten verschilt. Stellen wij dit aantal thrombocyten op 10^3 r per mm^3, waarbij r voor elke suspensie verschillend is, dan kunnen wij de waarde berekenen voor het N-gehalte van de thrombocyten in de verschillende suspensies, indien men geen rekening houdt met de bijmenging. De te vinden waarde wordt weergegeven door de formule

$$2,0 + \frac{12p + 4q}{100\,r} \text{ mg N.}$$

De formule stelt een gelijkzijdige hyperbool voor. Deze hyperbool heeft als asymptoten de horizontale lijn voor 2,0 mg N-gehalte, waartoe de kromme nadert, als r zeer groot wordt, en de verticale lijn voor 0×10^3 thrombocyten per mm^3 suspensie, waartoe de kromme nadert, als r zeer klein wordt. In figuur 3 ziet men dit geillustreerd voor een bijzonder geval waarbij p = 500 en q = 500. In deze figuur is te zien, hoe sterk de invloed van de bijmenging wordt als het aantal thrombocyten in de suspensie te zeer afneemt. Naar onze mening heeft Olef (73) in zijn publicatie over het thrombocytenvolume bij thrombopenische purpura, met de hierboven genoemde overwegingen onvoldoende rekening gehouden. Hij werkte met plasmasuspensies, die slechts een gering aantal thrombocyten per mm^3 bevatten.

Onze redenering is ook van toepassing indien men in de thrombocyten een stof wil bepalen, die in de leucocyten of in de erythrocyten in grotere concentratie aanwezig is dan in de thrombocyten.

Onze methode van isoleren verschilt in enkele opzichten van de methode van Stefanini en Dameshek (186). Het belangrijkste verschil is, dat door hen een zeer geconcentreerde suspensie gemaakt wordt van thrombocyten in physiologisch zout, deze suspensie wordt (na het tellen van het aantal thrombocyten) gebruikt voor de bepalingen. Bij onze methode wordt voor de bepalingen geen suspensie van thrombocyten in physiologisch zout gebruikt, maar de thrombocytenknoop. Het aantal in deze knoop aanwezige thrombocyten wordt berekend uit het aantal cc plasma, dat men heeft afgecentrifugeerd, en het aantal thrombocyten per mm^3 dat hierin aanwezig is voor afcentrifugeren. De voordelen van onze methode zijn, dat de thrombocyten in het plasma gemakkelijk te tellen zijn en er nooit



Figuur 3. Invloed van een constante bijmenging van 500 erythrocyten en 500 leucocyten per mm^3 op het berekende N-gehalte per 10^{10} thrombocyten, bij een wisselend aantal thrombocyten per mm^3 suspensie.

enige agglutinatie optreedt, wat bij een suspensie in physiologisch zout wel het geval is. Het aantal bewerkingen, dat de thrombocyten ondergaan, is tot een minimum gereduceerd, doordat ze slechts geresuspendeerd hoeven te worden indien verdere zuivering noodzakelijk is en dan nog in het plasma waaruit ze geisoleerd zijn. Ook is het niet nodig Triton WR-1339 te gebruiken ter voorkoming van agglutinatie. Doordat alle verdere bepalingen in dezelfde buis geschieden, kan er geen verlies meer aan thrombocyten ontstaan.

c. Bepaling van de phosphatase-activiteit in de thrombocyten

Voor de phosphatasebepalingen in de thrombocyten wordt vrijwel dezelfde methode gebruikt als voor de leucocyten.

Slechts worden geen celsuspensies gebruikt, maar van tevoren reeds in het thrombocytenplasma getelde en afgecentrifugeerde thrombocyten. Meer dan 20-30 cc bloed heeft men voor een bepaling niet nodig.

d. Isolatie DNA-fractie

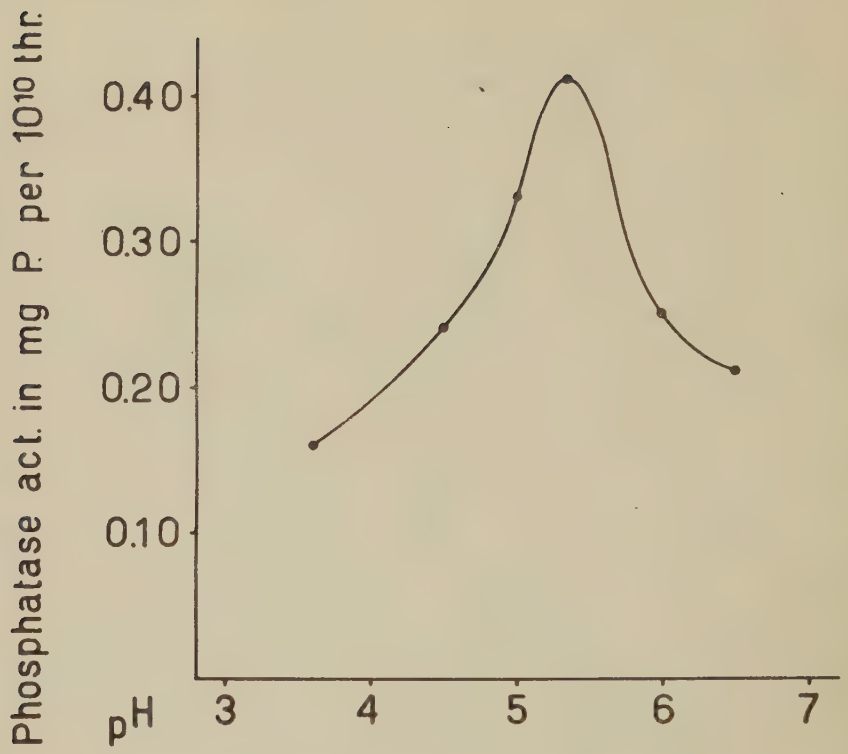
De isolatie van de DNA-fractie is volgens de methode van Schmidt en Thannhauser geschied (222). De geisoleerde thrombocyten (leucocyten) worden nadat $2\frac{1}{2}$ cc 10% trichloorazijnzuur toegevoegd is, gedurende een uur in de ijskast geplaatst. Hierna wordt het neerslag afgecentrifugeerd, het centrifugaat afgegoten en het neerslag nog tweemaal met 5%trichloorazijnzuur-oplossing geëxtraheerd. Het achtergebleven neerslag wordt met zo weinig mogelijk water overgebracht in een agathen mortier; hieraan wordt 25 mg lactose toegevoegd. Met phenolphtaleïne als indicator wordt de oplossing met 0,1 N NaOH juist alkalisch gemaakt, waarna 5 druppels 0,1 N zoutzuur toegevoegd worden. Het mortiertje wordt daarna in een exsiccator geplaatst. Als het poeder gedroogd en fijngewreven is, wordt het zorgvuldig overgebracht in een extractiehulsje en in een daarvoor geschikte proefopstelling gedurende 3 uur met een aether alc. abs. 3-1 mengsel geëxtraheerd. Het in de extractiehuls achtergebleven poeder wordt in een centrifugebuisje gebracht en opgelost in 2 cc 1 N NaOH en daarna 17 uur in een broedstoof geplaatst bij 37^{o}. Vervolgens wordt hieraan 3 cc aqua dest. 0,8 cc 2,5 N HCl en 2 cc 30% trichloorazijnzuur toegevoegd. Het neerslag wordt afgecentrifugeerd en tweemaal gewassen met 5% trichloorazijnzuur waarna het achtergebleven neerslag (de desoxyribonucleinezuurfractie) geschikt is voor de bepaling van de radioactiviteit.

e. Meting van de radioactiviteit

De meting van de radioactiviteit van de geisoleerde en op aluminiumbakjes overgebracht DNA-fractie is met een GM-eindvensterbuis geschied. Alle porties zijn zo lang geteld tot minstens 400 counts boven het nuleffect geregistreerd waren. De standaard-oplossing is bereid door 0,1 cc van het gebruikte P^{32} (ongeveer 0,1 μc) te brengen bij 1000 cc zure phosphaatoplossing (43,9 g K_2HPO_4 per 1000 cc). 0,1 cc van deze oplossing is ingeschaald en als standaard gebruikt.

III. RESULTATEN VAN DE ZURE-PHOSPHATASEBEPALINGEN IN DE THROMBOCYTEN

Uit enkele oriënterende onderzoekingen bleek, dat met de gebruikte methode, zowel met Na-alpha- als met Na-beta-glycerophosphaat als substraat, geen alkalische phosphatase aan te tonen was. Wel werd een aanzienlijke zure-phosphataseactiviteit gevonden. Nagegaan werd, waar het pH-optimum van



Figuur 4. Verband tussen pH en phosphatase-activiteit van de thrombocyten

dit zure phosphatase lag; hiervoor werd een veronalbufferoplossing gebruikt (Michaëlis). De resultaten van dit onderzoek zijn weergegeven in figuur 4. De pH werd telkens met een glaselectrode gecontroleerd, ook nadat het substraat toegevoegd was. Uit de curve blijkt, dat het pH-optimum ligt bij 5,4. Vervolgens werd de invloed nagegaan van enkele remstoffen en activatoren: zie tabel VII. Uit de uitkomsten blijkt, dat Co, Mg, Ca en Mn, indien toegevoegd aan de bepaling, geen invloed hebben; Cu, F en formaline echter remmen de activiteit. Verder werd in één geval de invloed van saponine onderzocht. Zonder saponine was er geen activiteit; met dezelfde hoeveelheid saponine als bij de bepalingen van de zure phosphatase in de leucocyten gebruikt werd (0, 5 cc 2%), bedroeg deze 0, 25 E per 10^{10} thrombocyten; met de dubbele hoeveelheid saponine 0, 15 E per 10^{10} thrombocyten. Met saponine kan dus het zure phosphatase vrijgemaakt worden. De verdere onderzoekingen werden verricht met dezelfde hoeveelheid sa-

ponine als gebruikt werd bij de leucocyten. Of saponine in deze concentratie ook enige remming geeft werd niet nagegaan.

TABEL VII

INVLOED VAN VERSCHILLENDE REMSTOFFEN EN ACTIVATOREN OP DE ZURE PHOSPHATASE-ACTIVITEIT THROMBOCYTEN

	Activator of remstof		Zure phosphatase-activiteit in mg P vrijgemaakt per 10^{10} thr per uur *)
1)	0.2 cc $MnCl_2$	0.05 M.	0.33
2)	0.2 cc $CoCl_2$	0.05 M.	0.44
3)	0.2 cc $CaCl_2$	0.2 M.	0.36
4)	0.2 cc $ZnCl_2$	0.05 M.	0.27
5)	0.2 cc $CuCl_2$	0.05 M.	0.025
6)	0.2 cc NaF	0.05 M.	0.09
7)	0.2 cc $MgCl_2$	0.05 M.	0.39
8)	0.2 cc Complexon	0.1 M.	0.44
9)	0.2 cc Formol (40% + 0.2 cc $MgCl_2$ 0.05 M.)		0.09
10)	geen		0.39

*) Alle bepalingen zijn verricht in identiek materiaal.

Hierna werd de phosphatase-activiteit onderzocht bij gezonden en bij patienten met verschillende aandoeningen. De resultaten bij gezonden en enkele gevallen van polycythaemia vera en chronische myeloide leukaemie (tabel VIII) geven de indruk, dat onder deze omstandigheden waarschijnlijk geen grote verschillen in phosphatase-activiteit bestaan. De gevonden waarden voor het zure phosphatase bij gezonden bedroegen 0,13 tot 0,41 per 10^{10} thrombocyten, gemiddeld 0,30 ± 0.08 (sd). Bij patiente De. met polycythaemia vera werd ook een bepaling van het zure phosphatase gedaan van thrombocyten die geisoleerd waren volgens de methode van Stefanini en Dameshek. Dit gaf geen verschil in uitkomst.

Wanneer men aanneemt dat het volume van de leucocyten ongeveer zestig maal zo groot is als van de thrombocyten, dan is het zure-phosphatasegehalte in de thrombocyten per volume-eenheid slechts weinig lager. Het zure-phosphatasegehalte van de erythrocyten daarentegen is veel geringer, nl. 15 E per 100 cc erythrocyten (187). Herhaalde bepalingen bij dezelfde personen geven geen groter verschil in uitkomst dan te verklaren is uit de fout van de methode (± 20%). De resultaten van het onderzoek bij een aantal patienten, bij wie de phosphatase-activiteit voor en één of meer dagen na een operatie bepaald werd, zijn weergegeven in tabel IX. Het blijkt, dat geen verschil tussen de phosphatase-activiteit van de thrombocyten-

TABEL VIII

ZURE PHOSPHATASE BEPALINGEN IN THROMBOCYTEN

Naam	Datum	Aantal Thromb. per mm^3 in susp.	Phosphatase-act. in mg P vrijgemaakt per 10^{10} thr. per uur	Diagnosen en opmerkingen
1 L.	7-3'55	255.000	0.41	Normalen
	9-3'55	245.000	0.39	
2 v V.	9-3'55	198.000	0.39	
	10-3'55	393.000	0.33	
3 S.	9-3'55	298.000	0.33	
	10-3'55	543.000	0.30	
4 Zw.	9-7'52	600.000	0.26	
	14-7'52	640.000	0.24	
5 Wi.	22-6'52	450.000	0.35	
	10-7'52	400.000	0.41	
6 Le.		300.000	0.31	
7 Ne.		400.000	0.24	
8 v D.		242.000	0.20	
9 Be.		535.000	0.35	
10 Je.		263.000	0.22	
11 v/d H.		385.000	0.19	
12 Sp.		372.000	0.21	
13 Die.		2.040.000	0.25	Chron. myel
14 Du.	25-6'52	236.000	0.21	leukaemie.
"	12-7'52	150.000	0,20	
15 He.		4.000.000	0.19	
16 v H.		530.000	0.20	
17 Ga.	11-7'52	1.040.000	0.29	Polycythae-
"	2-8'52	980.000	0.29	mia vera.
18 De.	15-6'52	4.500.000	0.36	
"	20-8'53	4.660.000	0.44	
"	10-11'53	994.000	0.48	
"	10-11'53	474.000	0.45	(suspensie in phy siol. zout)
19 Gro.		256.000	0.26	Thrombose
20 Po.		640.000	0.20	Febris e. c. i.
21 Wa.		351.000	0.19	Phlebothrombos en apoplexie
22 Ji.		234.000	0.18	Cholelithiasis
23 Pa.		720.000	0.32	Icterus Galstene

TABEL IX

ZURE-PHOSPHATASE ACTIVITEIT VAN DE THROMBYCYTEN BIJ OPERATIEPATIENTEN

Naam	Datum	Aantal thromb. mm^3 suspensie	Zure Phosph. in mg P. vrijgemaakt per 10^{10} thromb.	Opmerkingen
1 v. Gem.	25-11'53	555.000	0.23	Coloncarcinoom voor operatie
	14-12	448.000	0.25	7 dagen na operatie
2 Jo.	30-11'53	190.000	0.46	Galsteenlijden voor operatie
	9-12	355.000	0.45	Na operatie
	16-12	567.000	0.39	"
3 He.	2-12'53	339.000	0.36	Ulcus ventriculi voor operatie
	8-12	376.000	0.33	6 dagen na operatie
4 Pen.	11-12'53	250.000	0.31	Voor galblaasoperatie
	17-12	340.000	0.306	na operatie
	25-12	491.000	0.32	"
5 Ho.	12-12'53	150.000	0.29	Ulcus ventriculi voor operatie
	21-12	373.000	0.33	7 dagen na operatie
6 Vri.	21-12'53	740.000	0.32	Voor breukoperatie emphyzema pulmonum
	29-12	531.000	0.32	1 dag post operationem
7 Oud.	22-12'53	785.000	0.27	Pylorusstenose voor operatie
	27-12	712.000	0.28	Na operatie
	4-1 '54	920.000	0.30	"
8 Spa.	30-12'53	420.000	0.45	Voor operatie
	5- 1'54	390.000	0.36	Na operatie
9 v. d. Gr.	9- 8'53	302.000	0.17	Megalosplenie
	16- 8	1.900.000	0.21	6 dagen na splenectomie

prae- en postoperatief bestaat. Bij patient He. werd na de operatie een bepaling gedaan, terwijl enkele stolseltjes in het bloed aanwezig waren; het zure-phosphatasegehalte bedroeg 0,12 E per 10^{10} thrombocyten. Ook bij enkele andere bepalingen bij zeer geringe stolling van het bloed werden zeer lage uitkomsten voor het zure phosphatase verkregen. Bij patient Gr. was het mogelijk, door de sterke stijging die het aantal thrombocyten na miltextirpatie te zien gaf, een bepaling direct in het thrombocytenrijke plasma te doen. De gevonden waarde kwam overeen met die in de geisoleerde thrombocyten.

IV. RESULTATEN VAN HET ONDERZOEK MET P^{32} NAAR DE AANWEZIGHEID VAN EEN DNA-FRACTIE IN DE THROMBOCYTEN

Over de aanwezigheid van DNA in de thrombocyten staat niets met zekerheid vast. Wel is bekend, dat inbouw van P^{32} in DNA van de leucocyten plaats vindt. Om de door ons gevolgde methode van isolatie van de DNA houdende fractie te toetsen, werden een aantal experimenten met leucocyten verricht. Enige kennis van de waarden bij leucocyten is nodig voor een goede beoordeling van de bij de thrombocyten verkregen resultaten. De uitkomsten van dit onderzoek bij een tweetal patienten, na een proefdosis P^{32} van 3,8 µc per kg lichaamsgewicht, worden weergegeven in tabel X. Het blijkt, dat er activiteit in de DNA-fractie van de leucocyten aan te tonen is en dat deze activiteit resp. op de 10^{de} en 12^{de} dag hoger is dan op de 4^{de} en 6^{de} dag. Ter oriëntering werd bij bovengenoemde twee patienten tevens de opneming van P^{32} in de thrombocyten vervolgd. Het verloop van deze activiteit is te zien in tabel XI. De radioactiviteit in de thrombocyten blijkt een dag na inspuiting veel geringer te zijn dan bij latere bepalingen.

TABEL X

RADIOACTIVITEIT IN DE DNA-FRACTIE VAN DE LEUCOCYTEN OP VERSCHILLENDE DAGEN NA INSPUITING

Patient	Geinjiceerde dosis P^{32} in µc	Dag na inspuiting	Activiteit DNA-fractie per 10^{10} leuc. c.p.m.	% ingespoten dosis
1 Ba.	350	4	3.400	0.0025
		11	6.300	0.0047
2 Ru.	250	6	2.200	0.0021
		12	8.900	0.0060

De verkregen tellingen zijn vergeleken met een op dezelfde dag getelde standaard. Het aantal „counts" per minuut (c.p.m.) is gecorrigeerd voor het radioactiviteitsverlies na inspuiting.

TABEL XI

TOTALE OPNAME VAN P^{32} IN DE THROMBOCYTEN OP VERSCHILLENDE DAGEN NA INSPUITING

Patient	Dag na inspuiting	In totaal in de thrombocyten opgenomen P^{32} c.p.m. per 10^{12} thromb.	% toegediende dosis per 10^{12} thromb.
1 Ba.	1	15000	0.011
	4	36600	0.027
	11	68600	0.042
2 Ru.	1	8500	0.008
	6	52300	0.037
	12	37200	0.023

De verkregen tellingen zijn vergeleken met een op dezelfde dag getelde standaard. Het aantal c.p.m. is gecorrigeerd voor radioactiviteitsverlies na inspuiting. % toegediende dosis is opgegeven per 10^{12} thrombocyten omdat dit qua volume ongeveer overeenkomt met 10^{10} leucocyten.

Om na te gaan of een DNA-fractie in de thrombocyten aan te tonen was, werd aan een aantal patienten een speurdosis P^{32} gegeven. De resultaten van dit onderzoek zijn weergegeven in tabel XII. Het blijkt, dat er geen vaste lijn valt te ontdekken in het verloop van de activiteit van de DNA-fractie. De activiteit is meestal gering en vaak nauwelijks hoger dan het nuleffect. Wel schijnt er enige correlatie te bestaan tussen de leucocyten-bijmenging en de gevonden DNA-activiteit, welke de laatste dagen van het onderzoek in enkele gevallen zeer duidelijk is, b.v. bij patient 7 op de 11^{de} dag na inspuiting en bij patient 9 op de 12^{de} dag. Om dit te bevestigen en om te zien of het ontbreken van activiteit geen gevolg kon zijn van een te lage dosis P^{32}, werd dit onderzoek herhaald bij enkele patienten die voor hun leukaemie of polycythaemie een therapeutische dosis P^{32} gekregen hadden. De uitslag van dit onderzoek is te vinden in tabel XIII. De uitslagen komen overeen met die bij de proefpersonen na een speurdosis. De correlatie tussen de leucocytenbijmenging en de gevonden DNA-activiteit is thans nog opvallender.

V. BESPREKING VAN DE RESULTATEN

Gevonden werd, dat in de thrombocyten een aanzienlijke zure-phosphatase-activiteit bestaat, die op eenvoudige wijze met saponine (uit de thrombocyten) vrijgemaakt kan worden. Hiervoor konden wel remstoffen maar geen activatoren aangetoond worden. Het zure-phosphatasegehalte bepaald bij ver-

TABEL XII

RADIOACTIVITEIT IN DE DNA-FRACTIE VAN DE THROMBOCYTEN OP VERSCHILLENDE DAGEN NA INSPUITING

Patient nummer	Diagnose	Dosis P^{32} in µc	Aantal dagen na inspuiting	c.p.m. DNA-fractie per 10^{10} thromb.	Leucocyten bijmenging Aantal leuc. : 10^{6} per 10^{10} thr.
1	Hepatitis	180	3	5.6	3
			12	9..4	-
2	Prostaat carcinoom	550	4	7.4	2
			10	13.4	-
3	Hypertensie	225	4	3.1	1.4
4	Apoplexie	320	5	12.9	2.2
			11	6.9	8
5	Ang. Pectoris	320	2	1	0.8
			5	12	2.2
			10	13.9	6.2
6	Megalosplenie	270	2	4.3	-
			5	1	-
			10	9.5	2.3
7	Chron. Cor pulm.	450	2	1	-
			6	1.4	1.2
			11	50.6	14.2
8	Prostaat carcinoom	470	3	13.6	2.4
			6	1.5	-
			10	0	1.8
9	Ang. Pectoris	270	2	4	2.3
			8	4.7	-
			12	29.3	7.5
10	Apoplexie	270	4	1.6	1.2
			8	10.6	2.3
			11	0	2.2
11	Levercirrhose	225	4	5.5	17
			7	14	3.3
			11	7.5	-

schillende ziektetoestanden, geeft dezelfde uitkomsten als bij gezonden. Ook de opmerkelijke verstoring van het evenwicht tussen aanmaak en afbraak, gepaard gaande met een hoger percentage jeugdige cellen na operaties, heeft geen invloed op de zure-phosphataseactiviteit.

TABEL XIII

RADIOACTIVITEIT IN DE DNA-FRACTIE VAN DE THROMBOCYTEN OP VERSCHILLENDE DAGEN NA INSPUITING VAN EEN THERAPEUTISCHE DOSIS P^{32}

Pat.	Diagnose	Ingespoten P^{32} in m c	Aantal dagen na inspuiting	Opbrengst Thromb. x 10^{-9}	Bijmenging leuc. x 10^{-5}	Activiteit DNA in c. p. m. per 10^{10} thromb.
Die.	Chron. myel. leuk.	2	7	26	0	0
			10	7	0	0
Ba.	idem	1.5	7	5.5	2.2	64
So.	Polycythaemia Vera	4.5	1	1.3	2	0
			3	2.4	3	0
			5	1.9	0	0
			10	2.2	5.25	60
			12	2.9	7	64
			14	3.8	1.75	0

Opgegeven is de hoeveelheid thrombocyten die voor het onderzoek gebruikt is en de in totaal daarin aanwezige bijmenging van leucocyten.

De gevonden waarden voor de zure phosphatase bij gezonden komen ongeveer overeen met de waarden gevonden door Salvidio (0, 143 - 0, 350 mg P vrijgemaakt per uur uit 10^{10} thrombocyten). De door hem gevolgde methode verschilde van de onze: hij maakte het zure phosphatase uit de thrombocyten vrij door homogeniseren in een microhomogenisator en gebruikte $MgCl_2$ als activator. Volgens onze waarnemingen echter is $MgCl_2$ geen activator.

In tegenstelling met Salvidio konden wij geen activiteit met Na-alpha-glycerophosphaat als substraat aantonen, waarschijnlijk omdat dit phosphatase door saponine geremd wordt. Aangetoond is, dat saponine de dehydrogenase-activiteit van de thrombocyten met Na-alpha-glycerophosphaat als substraat remt (de alkalische-phosphataseactiviteit van de leucocyten met Na-alpha-glycerophosphaat als substraat wordt door saponine niet geremd). Dat saponine in de door ons gebruikte

concentratie althans enige remming in de zure-phosphatase-activiteit geeft, is niet uitgesloten.

Uit de resultaten van het onderzoek met P^{32} naar de aanwezigheid van DNA in de thrombocyten blijkt, dat ook langs deze weg geen kernsubstantie in deze cellen aangetoond kan worden.

De toeneming van de inbouw van P^{32} in de DNA-fractie van de leucocyten is in overeenstemming met de waarneming van andere onderzoekers (171). De verklaring hiervoor is, dat P^{32} in het DNA-molecuul slechts ingebouwd kan worden als een cel in mitose is (173). De activiteit in de DNA-fractie zal een geleidelijke stijging vertonen naarmate oudere cellen, waarin nog geen P^{32} in het DNA-molecuul ingebouwd is, door jongere vervangen worden. Dit is ook de reden waarom een bijmenging aan leucocyten bij het onderzoek naar DNA in de thrombocyten de uitkomsten pas later gaat beinvloeden.

De beschreven onderzoekingen tonen de moeilijkheden waarop een onderzoek naar de biochemie van de thrombocyten stuit. Het onderzoek met P^{32} naar de aanwezigheid van DNA demonstreert hoe voor een juiste beoordeling van de resultaten rekening gehouden moet worden met de bijmenging. Bij de bepaling van het zure-phosphatasegehalte is het de lysis, die de resultaten beïnvloedt, wanneer niet alle mogelijke voorzorgsmaatregelen getroffen worden. Van de leucocyten is bekend, dat een geringe beschadiging van de cel voldoende is om het lysozym tegelijk met andere bestanddelen in het plasma te doen vrijkomen. Ook de thrombocyt stort waarschijnlijk, zodra lysis ontstaat, een deel van zijn inhoud uit en blijkbaar hoort het zure phosphatase hierbij. Dit is ook beschreven door Zajicek en Datta maar dan voor het pyrophosphatase van rattenthrombocyten (zie hoofdstuk 4). Evenzo zijn pyrophosphatasen, afkomstig uit de erythrocyten, in haemolysaten aan te tonen. Bepaling van het zure-phosphatasegehalte van de thrombocyten zou misschien te gebruiken zijn als een criterium bij het beoordelen van de toestand waarin de thrombocyten zich na isoleren of bewaren bevinden. Een bijmenging met andere vormelementen zal de uitkomsten weinig beinvloeden, daar het zure phosphatase van de leucocyten Mg behoeft om geactiveerd te worden en het gehalte aan zure phosphatase van de erythrocyten veel lager is.

Hoofdstuk 7

ONDERZOEK NAAR DE LEVENSDUUR VAN LEUCOCYTEN EN THROMBOCYTEN MET DFP^{32}

I. LITERATUURGEGEVENS

a. Levensduur van de leucocyten.

In 1930 constateerde Weiskotten (156), dat bij stopzetting van de toevoer van granulocyten uit het beenmerg van konijnen door benzoltoediening na ongeveer drie tot vier dagen geen granulocyten meer in het bloed gevonden werden. Door bij verschillende proefdieren lymfe uit de ductus thoracicus te verzamelen onderzochten Yoffrey (157), Adams e. a. (158) en Reinhardt e. a. (159) hoeveel lymfocyten per tijdseenheid in de circulatie komen. Uit de verhouding hiervan met het totaal aantal in het periphere bloed aanwezige lymfocyten berekenden zij een levensduur van de lymfocyten van 10 - 12 uur. Lawrence e. a. (160) dienden leucocyten toe aan katten die door bestraling agranulocytotisch gemaakt waren door middel van een kruiscirculatie van carotis tot carotis met normale katten. Door na te gaan hoe snel de getransfundeerde leucocyten na stopzetting van de kruiscirculatie uit het bloed verdwenen waren, kwamen zij tot een gemiddelde levensduur van 16 uur. Van Dijke en Huff (161) berekenden uit waarnemingen bij parobiotische ratten, van wie zij er één door bestraling agranulocytotisch gemaakt hadden, een levensduur van de granulocyten in het periphere bloed van 23 minuten en van de lymfocyten van 170 minuten. Hirsch en Gardner (162) constateerden, dat bij mensen de overlevingsduur van getransfundeerde leucocyten langer was dan 6 uur en korter dan 24 uur. In tegenstelling hiermee vonden Lanman, Bierman en Byron (163), dat transfusie van bloed, dat zeer veel leucocyten bevatte, slechts tijdens de transfusie een geringe stijging van het aantal leucocyten in het periphere bloed tengevolge had. Na de transfusie daalde het aantal weer snel tot het oude niveau. Later vonden Bierman, Byron en Kelley (164) evenwel, dat bloed van leukaemiepatienten, indien getransfundeerd bij andere patienten met verschillende soorten leukaemie, wel een aanzienlijke stijging van het aantal leucocyten gaf. Zij meenden uit hun proeven de conclusie te mogen trekken, dat de leucocyten

vooral in de longen uit de circulatie verwijderd werden. Weisberger e. a. (165) merkten konijnenleucocyten met P^{32} en transfundeerden deze cellen bij andere konijnen; 30 minuten na de transfusie vonden zij de meeste activiteit terug in de longen. Seyderhelm en Oesterreich (166) injiceerden leucocyten, die met een vitale kleurstof (congorood) behandeld waren, bij konijnen. Dertig minuten na inspuiting werd het meeste congorood in de longen, drie uur daarna in de lever teruggevonden. Farr (167) volgde het verloop van bij konijnen getransfundeerde lymfocyten (gemerkt met de vitale kleurstof acriflavine hydrochloride). Hij vond, dat tot 72 uur na de transfusie nog een klein aantal in de circulatie bleef. White onderzocht de overlevingsduur van met atebrine gemerkte getransfundeerde leucocyten bij mensen (168). Bij niet-leukaemische patienten kon bij slechts een gering aantal gemerkte cellen terugvinden. Bij leukaemiepatienten vond hij daarentegen een sterkere stijging, welke na 60 minuten nog steeds te constateren was.

Ook langs meer indirecte weg heeft men getracht de levensduur van de leucocyten te bepalen. Lawrence e. a. (160) berekenden een levensduur van de granulocyt van 7, 2 uur. Zij gingen hierbij uit van een levensduur van de erythrocyten van 100 dagen, een verhouding leucopoietisch weefsel: erythropoietisch weefsel in het beenmerg 4 : 1 en een verhouding van het totaal erythrocytenvolume : leucocytenvolume in het periphere bloed 80 : 1. Als men aanneemt dat de productiesnelheid van erythropoietisch en leucopoietisch weefsel gelijk is, zou dus in het periphere bloed viermaal zo veel leucocyten als erythrocyten moeten zijn. In werkelijkheid is de verhouding van leucocyten- en erythrocytenvolume 1 : 80. Dit verschil kan alleen verklaard worden uit een verschil in levensduur van de twee celsoorten. Zo berekend zou de levensduur van de leucocyten 0, 3 dagen moeten zijn. Esselier e. a. (170) volgden het verloop van de eosinophiele cellen in het periphere bloed na toediening van ACTH. Na staken van de ACTH-toediening zagen zij, dat de ontstane eosinopenie gevolgd werd door een „overshooting" (regeneratie eosinophilie), tengevolge waarvan zij weer een eosinopenie zagen ontstaan. Uit de curve, die zij zo kregen berekenden zij een totale levensduur van de eosinophiele cellen van ongeveer 6 dagen.

Op verschillende wijzen heeft men getracht de leucocyten in vivo te merken met radioactieve isotopen. Boyd e. a. (169) vonden na toediening van met C^{14} gemerkt glycine met behulp van radioautogrammen, dat de lymfocyten een naar verhouding grotere activiteit vertoonden dan de granulocyten. Op grond hiervan uitten zij de veronderstelling, dat de vernieuwing van de lymfocyten sneller zou zijn dan die van de granulocyten.

Uit het verloop van de opnaming van P^{32} in de DNA-fractie heeft men gemeend conclusies te kunnen trekken over de totale levensduur van de leucocyten. Zo vonden Kline en Cliffton (171) bij gezonden een waarde van 13 dagen. Osgood e. a. bij

gevallen van chronische myeloide leukaemie een levensduur van de granulocyten van 4 dagen en bij chronische lymfatische leukaemie een levensduur van de lymfocyten van meer dan 30 dagen (221).

Weisberger en Levine (172) gingen de incorporatie in vivo na van aminozuren in de leucocyten. Zij gebruikten hiervoor S^{35} L-methionine, S^{35} L-cystine en S^{35} anorganisch sulfaat, die zij oraal gaven en C^{14} formiaat, dat zij parenteraal toedienden. Zij meenden, ondanks de mogelijkheid van reütilisatie, uit hun curve van het verloop van de activiteit in de leucocyten de levensduur van de leucocyten op 9 - 13 dagen te kunnen schatten. De levensduur bij chronische myeloide leukaemie was enkele dagen korter, die bij acute leukaemie veel korter, die bij chronische lymfatische leukaemie veel langer dan bij gezonden (enkele maanden).

Zoals uit bovenstaande opsomming blijkt, zijn zeer sterk uiteenlopende waarden gevonden. Dit is niet te verwonderen, daar de verschillende onderzoekers niet alleen niet dezelfde proefdieren, maar ook geheel verschillende methoden van onderzoek gebruikten. Op vele van deze methoden is critiek mogelijk. In de eerste plaats zijn alle in-vitro-methoden als onbetrouwbaar te beschouwen ten gevolge van de grote kwetsbaarheid van de leucocyten. Experimenten bij bestraalde proefdieren zijn onbetrouwbaar, omdat overgang niet alleen van de erythrocyten maar ook van de granulocyten in de lymphebaan voorkomt indien een haemorrhagische diathese ontstaat (82). Verder kan bij mensen of proefdieren met agranulocytose een abnormaal sterke afbraak van leucocyten bestaan. Het is te verwachten, dat lymfocyten, monocyten en de verschillende soorten granulocyten niet alle dezelfde levensduur zullen hebben. Niet iedereen verstaat onder de levensduur van de leucocyten hetzelfde. Sommigen bedoelen hiermee alleen de tijd die de cellen doorbrengen in het periphere bloed (dus de tijdsduur die verloopt tussen het vrijkomen van de cellen uit het beenmerg of de lymfklier en het tijdstip, dat de cel te gronde gaat of de bloedbaan weer verlaat), anderen ook de rijpingsduur van de cellen in beenmerg en lymfklier. Voor de cellen in het beenmerg is deze laatste door Kline en Cliffton op 4 dagen geschat. Doordat de leucocyten niet aan de bloedbaan gebonden zijn, maar eruit kunnen treden en daarna opnieuw de bloedbaan kunnen binnenkomen, wordt de bepaling van de levensduur nog meer bemoeilijkt. Waarschijnlijk sterven de granulocyten in het periphere bloed af: Sabin e.a. (174) vonden b.v., dat er elk uur een rhytmische fluctuatie van de leucocyten optreedt, waarbij een top ontstaat, die voorafgegaan wordt door een periode waarin zwermen afstervende leucocyten in de circulatie waargenomen worden. De lymfocyten verlaten waarschijnlijk voor het grootste deel via de darmepitheliën de bloedbaan.

De lange levensduur van de lymfocyten, die bepaald wordt uit de inbouw van P^{32} in het DNA-molecuul, kan hieruit ver-

klaard worden, dat de gemerkte stoffen telkens opnieuw gebruikt worden voor aanmaak van lymfocyten. Volgens nog niet gepubliceerde onderzoekingen zou zelfs een half leven van 250 dagen gevonden zijn (175).

Hoewel de meeste waarnemingen wijzen op een korte levensduur van de leucocyten, althans in het periphere bloed, is onze kennis nog zeer onvoldoende. Dit is waarschijnlijk niet alleen een gevolg van het ontbreken van een betrouwbare techniek om de cellen te merken, maar misschien nog meer van bovengenoemde complicerende factoren.

b. Levensduur van de thrombocyten.

In sommige opzichten is het bepalen van de levensduur van de thrombocyten in beginsel eenvoudiger dan van de leucocyten. Bij de thrombocyten heeft men niet zoals bij de leucocyten te maken met verscheidene celsoorten, die waarschijnlijk alle een verschillende levensduur hebben, maar met slechts één celtype. Verder komen onder normale omstandigheden de thrombocyten slechts intravasculair voor, al zou volgens sommige onderzoekingen de long een reservoirfunctie kunnen vervullen (176). Desalniettemin zijn slechts weinig betrouwbare gegevens verzameld over de levensduur van de thrombocyten in het periphere bloed en over de rijpingsduur van deze cellen in het beenmerg. Onbekend is hoe en waar zij te gronde gaan en de omvang van het verbruik onder verschillende omstandigheden. De verklaring hiervoor moet gezocht worden in de moeilijkheden tot voor kort ondervonden bij het isoleren van deze cellen, de onvoldoende kennis van de biochemische samenstelling en het ontbreken van een techniek om de thrombocyten te merken. Ook bestaat geen eenvoudige methode om het percentage circulerende jonge cellen te bepalen, of om vast te stellen hoe groot de afbraak is.

Kennis van de levensduur zou van grote betekenis kunnen zijn. Hierdoor zou men meer inzicht kunnen krijgen in de belangrijke veranderingen in aantal (en waarschijnlijk ook in eigenschappen) van de thrombocyten, zoals die bij de meest uiteenlopende gevallen (als bij operatiepatienten (177), na leverbehandeling van perniciosapatienten (178), na bloedingen (179) enz.) voorkomen.

De meeste gegevens over de levensduur van de thrombocyten zijn verkregen door transfusie-experimenten (180,181,182, 183, 184, 185, 186). Tegen deze experimenten zijn verschillende bezwaren aan te voeren. De ontvanger was vaak een patient met een thrombopenie, waarbij een verhoogde afbraak van thrombocyten kan bestaan (192) (idiopathische thrombopenische purpura, thrombopenieën na bestraling). Verder bezitten de thrombocyten een antigene structuur en bestaan er waarschijnlijk van de thrombocyten evenals van de erythrocyten bloedgroepen. Door de technische moeilijkheden, ondervonden bij het bepalen van de bloedgroep van de thrombocyten, bestaat

geen overeenstemming over het aantal verschillende bloedgroepen van de thrombocyten en over het verband tussen de bloedgroepen van de erythrocyten en van de thrombocyten (190, 191). Hoe dit ook zij, gebleken is dat bij het toedienen van herhaalde transfusies aan dezelfde patient de overlevingsduur van de thrombocyten steeds korter wordt (162). Een groot bezwaar is verder, dat de thrombocyten die getransfundeerd worden, door de hiervoor nodige manipulaties beschadigd worden. Indien geen plastic of gesiliconiseerd materiaal gebruikt wordt, gaat 75% of meer van de thrombocyten door lysis te gronde voor zij de circulatie van de ontvanger bereikt hebben. De gebruikte techniek van transfunderen is van grote invloed op de overlevingsduur. Gardner e. a. (194) vonden, dat deze het langst is indien het afgenomen bloed dadelijk weer met spuiten gereinjiceerd wordt. Worden de thrombocyten eerst uit het bloed geisoleerd, dan is de overlevingsduur korter, vooral wanneer zij niet in hun eigen plasma, maar in physiologisch zout geresuspendeerd worden. De waarden voor de overlevingsduur, bij deze experimenten gevonden, variëren van 3-5 dagen. Soms was een klein deel van de thrombocyten na 8 dagen nog in de circulatie aan te tonen (181). Een van de eerste pogingen tot het bepalen van de levensduur is die van Duke geweest (193). Deze maakte honden thrombopenisch door herhaalde aderlatingen, waarbij het afgenomen bloed na defibrinering opnieuw getransfundeerd werd. Uit het verloop van de regeneratie van de thrombocyten berekende hij een levensduur van enkele dagen. Ook meende hij uit deze proeven te mogen besluiten dat een te kort aan thrombocyten een prikkel tot versterkte regeneratie zou zijn.

Lawrence en Valentine (195) deden onderzoekingen op dezelfde wijze als zij dit voor leucocyten gedaan hadden (door middel van een kruiscirculatie van carotis tot carotis tussen een gezonde kat en een door bestraling thrombopenisch gemaakte kat). In iets meer dan 4 dagen waren de thrombocyten van de ontvanger weer verdwenen. Deze overlevingsduur komt ongeveer overeen met de experimentele resultaten door andere onderzoekers bij dierproeven verkregen (196).

Hirsch, Favre Gilly en Dameshek (197) transfundeerden bloed van een polycythaemische donor met een zeer hoog thrombocytengetal bij een patient met een thrombopatische purpura. Daar de normale getransfundeerde thrombocyten morphologisch te onderscheiden waren van die van de ontvanger, kon de overlevingsduur bepaald worden. Deze bedroeg 5-6 dagen. Hirsch en Gardner (162) meenden uit transfusie-experimenten te kunnen concluderen, dat het verbruik van de thrombocyten, in de weefsels bij patienten, die lange tijd geleefd hadden met een ernstig te kort aan thrombocyten, waarschijnlijk gering is. Zij vonden nl. dat het percentage van de getransfundeerde thrombocyten, dat zij bij deze patienten in de circulatie konden aantonen, na een tweede transfusie niet hoger was dan na de eerste.

Ook heeft men naar methoden gezocht om door merking in vivo of in vitro de levensduur van de thrombocyten te bepalen. Odell, Gamble en Furth (198) merkten rattenthrombocyten in vivo met C^{14} gemerkt formiaat (HCOOK). Na een enkele injectie van het formiaat namen zij met verschillende tussenpozen bloed af. Zij vonden een maximum aan activiteit in de thrombocyten 3 dagen na injectie, daarna een snelle daling, welke een levensduur van 3-4 dagen deed veronderstellen. Odell, Tausche en Furth (199) transfundeerden in vivo met C^{14} formiaat of S^{35} methionine gemerkte thrombocyten in ratten; uit het verloop van de activiteit in de thrombocyten bij de behandelde dieren kwamen zij tot een levensduur van 5 dagen.

Udenfriend en Weisbach (200) merkten serotonine (5 HTA) in konijnenthrombocyten door toediening van met C^{14} gemerkt tryptophaan en vonden een half leven van het thrombocyten 5 HTA van $2\frac{1}{2}$ dag, wat overeenkomt met de gevonden waarde voor de konijnenthrombocyten. De verversing van het 5 HTA uit de maag en darm bleek sneller te geschieden. Zij meenden hieruit te mogen concluderen, dat 5 HTA ingebouwd en gesynthetiseerd wordt op de plaats, waar de thrombocyten gevormd worden en dat het metabolisch inactief blijft, totdat de thrombocyt uiteenvalt.

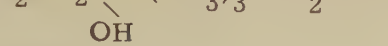
Bij proeven, waarbij in vitro met Cr^{51} gemerkte thrombocyten getransfundeerd werden in door röntgenbestraling thrombopenisch gemaakte ratten, bleek dat de binding van het Cr^{51} in vivo niet zo effectief was als in vitro, doordat een deel van het Cr^{51} reeds vóór het afsterven van de thrombocyten de cel verlaten had (189). Even onbevredigende resultaten werden verkregen met thrombocyten welke met J^{131} gemerkt waren (188).

Uit het bovenstaande blijkt, dat tot nu toe geen bevredigende methode om de levensduur van de thrombocyten te bepalen beschreven is.

c. Diispropylfluorophosphonaat (DFP).

Diisopropylfluorophosphonaat (DFP) behoort tot de groep der zenuwgassen, d. i. een groep van organische esters van phosphonzuur, waarvan sommige tengevolge van hun vluchtigheid en toxiciteit tot de gevaarlijkste gassen voor de chemische oorlogvoering behoren. DFP, waarvan de structuurformule is $\frac{H_7C_3\ O}{H_7C_3\ O}\ P\ \frac{O}{F}$, is ongeschikt als oorlogsgas. Wel is er gebruik van gemaakt voor medische doeleinden, o. a. bij de behandeling van myasthenia gravis. De pharmacologische werking berust op de eigenschap een irreversibele binding aan te gaan met cholinesterase, het enzym dat nodig is voor de afbraak van acetylcholine.

(acetylcholine)



(choline)

Zoals vrijwel algemeen wordt aangenomen, is acetylcholine nodig voor de overdracht van zenuwprikkels in de eindplaten van de motorische zenuwen, de sympathische en parasympathische ganglien en de periphere parasympathische zenuwuiteinden. Wij zullen geen uitgebreid literatuuroverzicht geven over de kennis van deze stof, maar verwijzen hiervoor naar de publicaties van Grob e. a. (202) Cohen (203), Koelle (201) en het uitgebreide onderzoek naar de stofwisseling van met P^{32} gemerkt DFP bij de mens door Cohen en Warringa (10). Hier zij slechts ingegaan op enkele eigenschappen van deze stof, waarvan kennis noodzakelijk is voor een goed begrip van de hier te beschrijven experimenten.

De resorptie van intramusculair toegediend DFP uit de spierdepôts geschiedt zeer snel (10). Een deel van het DFP reageert met eiwitten van de erythrocyten, het bloedplasma en de weefsels. Deze reacties zijn irreversibel en het catabolisme van de reactieproducten vindt met dezelfde snelheid plaats als van de oorspronkelijke eiwitten. Een groot deel wordt waarschijnlijk in de weefsels tot diisopropylphosphaat (DIP) gehydrolyseerd en voornamelijk met de urine, voor een kleiner gedeelte met de faeces uitgescheiden.

Niet alleen cholinesterasen reageren met DFP, maar ook een aantal andere enzymen, zoals chymotrypsine, trypsine, aliesterase enz. (204, 205). Al deze bindingen zijn irreversibel. Waarschijnlijk verliest het DFP, wanneer het reageert, zijn fluoratoom (206). Daar de binding irreversibel is, kan het aan het eiwit gebonden deel in het DFP-molecuul pas weer vrijkomen als het eiwit waaraan het gebonden is, wordt afgebroken. Er is slechts één omzettingsproduct van DFP: het DIP, dit neemt verder niet deel aan stofwisselingsprocessen, maar wordt onmiddellijk onveranderd uitgescheiden (10). Als de toediening van DFP gestaakt wordt, komen de enzymen, die gebonden zijn niet weer vrij en er ontstaat geen binding aan nieuw gevormde enzymen, omdat geen actief DFP meer aanwezig is. Het herstel van de enzymactiviteit na staken van de toediening van DFP is dus afhankelijk van de regeneratie van nieuw enzymeiwit. De erythrocyten zijn niet in staat eiwitten te vormen, zodat na irreversibele inactivatie van een enzym in deze cellen het opnieuw verschijnen van enzymactiviteit slechts betekenen kan, dat nieuw gevormde cellen in de circulatie geko-

men zijn. Aangezien nieuwe cellen bij een evenwichtstoestand slechts in de circulatie komen ter vervanging van afgestorven cellen, moet de snelheid van regeneratie van de enzymactiviteit een maat zijn voor de levensduur van deze cellen. Bepaling van deze regeneratiesnelheid zou een methode kunnen zijn om de levensduur van deze cellen te bepalen. Een bezwaar is, dat voor het verkrijgen van een meetbare daling van de enzymactiviteit een hoge dosis DFP gegeven moet worden, en hoewel omtrent de functie van deze enzymen in de cellen geen gegevens bekend zijn, is te verwachten, dat door een sterke remming de cel beschadigd wordt en zich niet meer op dezelfde wijze zal blijven gedragen als normale cellen. Dit laatste wordt door de resultaten van enkele onderzoekingen waarschijnlijk gemaakt (207, 208). Ook bestaat er geen methode om de hoeveelheid DFP, in de weefsels aanwezig, vast te stellen. Om deze bepaling van DFP in de weefsels en in de cellen toch mogelijk te maken, was het noodzakelijk deze stof te merken. Het lag voor de hand, dat hiervoor het phosphoratoom gebruikt zou worden. Zo is in 1948 voor het eerst DFP^{32} bereid (209) en door Jandorf e. a. (206) gebruikt om bij konijnen de verdeling van DFP over de weefsels en het verloop van de activiteit na te gaan. Cohen e. a. zijn erin geslaagd DFP van zeer hoge specifieke activiteit te synthetiseren (10), waardoor het mogelijk was deze stof te gebruiken voor onderzoek bij mensen. Het verloop van de P^{32}-activiteit in de erythrocyten deed veronderstellen, dat het mogelijk zou zijn deze methode te gebruiken voor het bepalen van de levensduur van de erythrocyten. Gevonden werd, dat ongeveer 10 dagen na toediening de P^{32}-activiteit in de erythrocyten begon te dalen. Deze daling had een rechtlijnig verloop. De snelheid van de daling kwam overeen met een levensduur van de erythrocyten van 110 dagen.

Slechts een gering percentage van het aan de erythrocyten gebonden DFP gaat een binding aan met actieve cholinesterasegroepen, het overgrote deel met andere enzymen van de erythrocyten (10). De afwezigheid van cholinesterase in thrombocyten en leucocyten sluit daarom een binding van DFP aan deze cellen niet uit, te meer daar in beide celsoorten een aanzienlijke esterase-activiteit aangetoond is (45, 114). Te verwachten is, dat een dergelijke binding ook irreversibel is en slechts verbroken zal worden bij desintegratie van deze cellen. Het enige afbraakproduct van DFP zal weer DIP zijn, dat onmiddellijk met de urine wordt uitgescheiden. Hierdoor zal gemerkt materiaal niet opnieuw in de thrombocyten en leucocyten ingebouwd worden, Verval van aan thrombocyten en leucocyten gebonden radioactiviteit zal een maat zijn voor het afsterven of het uit de bloedbaan verdwijnen van deze cellen. Daar de resorptie zeer snel geschiedt, zullen de cellen na toediening van DFP in betrekkelijk korte tijd gemerkt worden. Er bestaan dus gegronde redenen om aan te nemen, dat een

binding van DFP aan thrombocyten en leucocyten ook gebruikt zal kunnen worden voor het bepalen van de levensduur van deze cellen. Een dergelijke methode heeft het grote voordeel, dat de cellen in vivo gemerkt worden in plaats van in vitro, waarbij men altijd rekening moet houden met beschadiging van de cellen.

Voor het verkrijgen van betrouwbare gegevens over de levensduur van de thrombocyten en leucocyten is het niet voldoende dat er een binding plaats vindt van DFP^{32} aan deze cellen, maar zal nog aan verschillende andere voorwaarden voldaan moeten worden. In de eerste plaats zal voor een betrouwbare bepaling van de radioactiviteit voldoende DFP^{32} in de cellen ingebouwd moeten worden. De inbouw van DFP^{32} in de cellen is beperkt door het bestralingsrisico voor de patient en de toxiciteit van DFP, waardoor de te onderzoeken cellen beschadigd kunnen worden. De opneming mag niet veel geringer zijn dan in de erythrocyten, daar anders de beoordeling van de resultaten door een geringe bijmenging met erythrocyten ernstig bemoeilijkt wordt. Om deze bijmenging te voorkomen zal men de cellen zeer zuiver moeten isoleren. Daar grotere zuiverheid alleen bereikt kan worden ten koste van de opbrengst, zal men meer bloed moeten afnemen. Afneming van grotere hoeveelheden bloed is niet alleen bezwaarlijk voor de patient, maar zal ook het normale evenwicht tussen aanmaak en afbraak verstoren.

In de tweede plaats mag het DFP zich niet binden aan de cellen van het beenmerg, daar hierdoor een grote nalevering van gemerkte cellen aan het periphere bloed zou ontstaan. Een dergelijke nalevering zal door de veel kortere levensduur van de leucocyten en thrombocyten een veel grotere invloed hebben op de resultaten dan bij de erythrocyten, waar bij een levensduur van omstreeks 120 dagen een nalevering gedurende enkele dagen van niet veel betekenis zal zijn.

II. EXPERIMENTELE METHODEN

a. Bereiding en toediening van DFP^{32}.

Het bij de volgende proeven gebruikte DFP^{32} was bereid in het Medisch Biologisch Laboratorium der R. V. O. -T. N. O. in Rijswijk uit $H_3P^{32}O_4$, geleverd door het A.E.R.E. te Harwell. De bereikte specifieke activiteit varieerde van 9 µc tot 200 c per mg DFP. Voor injectie werd gebruikt een oplossing van DFP^{32} in olie, die verkregen werd door uitschudden van een steriele waterige oplossing van DFP^{32} met steriele arachisolie. Om de resorptie te bevorderen werd het DFP bij elke proef op twee plaatsen intramusculair gegeven. Om de gegeven dosis te bepalen werden de spuiten voor en na inspuiting gewogen.

b. Isolatie thrombocyten en leucocyten.

Bloedafneming, isolatie van de thrombocyten, telling en berekening van de bijmenging geschiedde zoals beschreven is in hoofdstuk 6. Voor elke bepaling werd ongeveer 40-45 cc bloed afgenomen. Om uit hetzelfde bloed zowel de thrombocyten als de leucocyten te isoleren, werd het na afcentrifugeren van de thrombocyten verkregen plasma weer bij de rest van het bloed gebracht; hieruit werden dan met behulp van dextran of van een fibrinogeenoplossing de leucocyten geisoleerd (zie hoofdstuk 3).

De zo verkregen leucocytensuspensie bevat ca één leucocyt op één erythrocyt. Verdere scheiding is noodzakelijk. Hiervoor is in de literatuur echter geen duidelijke methode beschreven. De oplossing werd gevonden door de leucocytensuspensie in physiologisch zout 20 tot 30 minuten bij kamertemperatuur te laten staan. Er komt dan een tijdstip, waarop het grootste deel van de leucocyten uitgezakt is, maar het grootste deel van de erythrocyten nog in de bovenstaande vloeistof gesuspendeerd is. Afpipetteren van de bovenstaande vloeistof en resuspenderen van de achtergebleven leucocyten in physiologisch zout geeft een suspensie die ongeveer één erythrocyt of zelfs nog minder per 10 leucocyten bevat. Een dergelijk snel uitzakken kan alleen verklaard worden door agglutinatie van de leucocyten. Deze verdere zuivering gaat niet altijd even vlot; soms is het moeilijk een voldoende opbrengst aan leueocyten te verkrijgen, dan weer is de scheiding van de erythrocyten niet volledig. Door resuspenderen en telkens weer opnieuw laten uitzakken lukt het op den duur altijd het gestelde doel te verwezenlijken.

Door deze herhaalde manipulaties zijn de leucocyten vaak irreversibel geagglutineerd, waardoor telling van het aantal cellen niet meer mogelijk is. Een bijmenging met erythrocyten kan dan nog slechts macroscopisch beoordeeld worden.

Voor de bereiding van het haemolysaat werden de erythrocyten van het plasma gescheiden door afcentrifugeren, daarna driemaal gewassen met physiologisch zout en aangevuld tot het oorspronkelijk volume met aqua destillata.

c. Bepaling van de radioactiviteit.

Plasma en haemolysaat werden al naar de te verwachten activiteit meer of minder verdund in een vloeistof-GM-teller (Veall 1948) geteld. Leucocyten en thrombocyten werden met een gelijk volume 30% NaOH in een waterbadje van 100° C gedurende ongeveer 30 minuten gedestrueerd, daarna met water aangevuld tot 10 cc. Vervolgens werd de in dit volume aanwezige activiteit bepaald. Hierbij werden de gebruikelijke criteria aangelegd. Steeds werd gelijktijdig een standaardoplossing van bekend DFP en P^{32}-gehalte meegeteld, bereid uit hetzelfde DFP als voor de proef gebruikt was.

d. Berekening van het DFP-gehalte per gram N of per aantal thrombocyten.

Het stikstofgehalte van de verschillende fracties werd bepaald met een micro-Kjehldahlmethode. Voor de bepalingen werd 1 cc van het plasma, 1 cc van het haemolysaat of 1 cc van de telvloeistof van de thrombocyten of leucocyten gebruikt. Het DFP-gehalte van de verschillende fracties werd bepaald met behulp van de volgende formules:

$$\frac{\text{cnts/min.}}{\text{st.}} \times \text{DFP st.} \times \frac{1000}{\text{mgN / cc vol.}} = \mu\text{g DFP / g N.}$$

$$\frac{\text{cnts/min.}}{\text{st.}} \times \text{DFP st.} \times \frac{5 \times 10^{12}}{\text{aantal thr. in telvol.}} = \mu\text{g DFP/5} \times 10^{12} \text{ thr.}$$

waarin: cnts/min. = cnts/min. telvolume van de gemeten fractie

st. = cnts/min. telvolume van de standaardoplossing.

DFP st. = μ g DFP van de standaard in het telvolume.

Bij de berekening werd het gehalte aan DFP^{32} opgegeven per 5×10^{12} thrombocyten, omdat dit aantal ongeveer overeenkomt met 1 g N. Tevens werd nagegaan of niet een deel van het aantal gevonden cnts, en het gevonden stikstofgetal ten laste kwam van de bijmenging. Z_o nodig werd hier een correctie voor stikstof en activiteit aangebracht.

e. Haematologische contrôle van ingespoten patienten.

Haemoglobine-gehalte, erythrocyten-, thrombocyten- en leucocyten-aantal werd gecontrôleerd en een differentieeltelling van de leucocyten van het periphere bloed verricht.

f. Patientenmateriaal.

Dit onderzoek werd bij 9 patienten verricht. Een opgave van de ingespoten patienten, de hoeveelheid DFP^{32} en het aantal μc P^{32} die werden toegediend is te vinden in tabel XIV.

F was een geval van polycythaemia vera, dat sinds enige jaren behandeld was met aderlating en P^{32}. E was een patient met een lichte t. b. c. pulmonum, bij wie bij toeval de kenmerkende afwijkingen van een chronische myeloide leukaemie in het periphere bloed en in het sternaalmerg ontdekt waren. Bij beiden was géén vergrote milt palpabel.

Van de overige patienten was G herstellende van een apoplexie. B en D deden een rustkuur voor een ulcus bulbi, dat geen activiteitsverschijnselen meer vertoonde. A had een thrombose en een longembolie gehad na een pneumonie; C had een aanval gehad van asthmatische bronchitis; beiden waren alweer hersteld ten tijde van het onderzoek.

Bij geen van deze 5 patienten waren er redenen om reactieve veranderingen in de thrombocyten aan te nemen. Tijdens het onderzoek ontstond bij geen van deze patienten enige wijziging

in het klinische beeld. Verschijnselen tengevolge van de toediening van DFP deden zich niet voor. Gegevens over patient H en I zijn te vinden in hoofdstuk 8.

TABEL XIV

GEGEVENS PATIENTEN DIE DFP^{32} TOEGEDIEND KREGEN

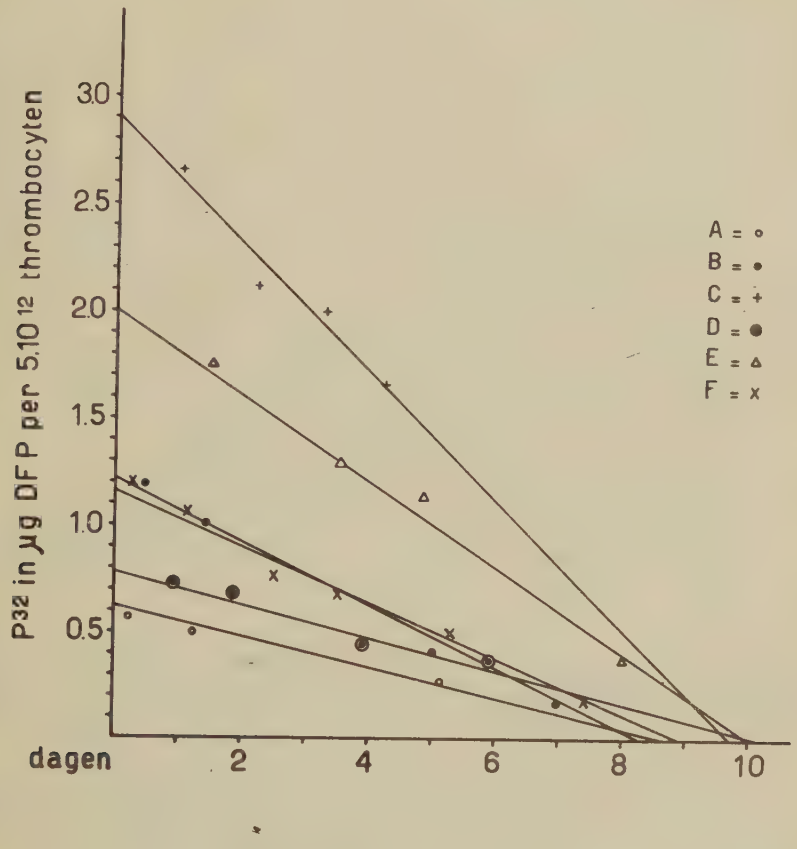
Patient	Geslacht Leeftijd	Diagnose	Gewicht	Geinjiceerde dosis mg DFP^{32}	µc P^{32}
A	m 68 jr	Genezen thrombose	70 kg	0,515	90
B	m 17 jr	Ulcus bulbi	71 kg	0,654	61
C	m 71 jr	Asthma bronchiale	66 kg	1,37	107
D	m 49 jr	Ulcus bulbi	75 kg	0,411	40
E	v 66 jr	Chron. myel. leuk.	39 kg	9,63	102
F	m 58 jr	Polycythaemia vera	91 kg	1,37	124
G	v 69 jr	Apoplexie	85 kg	1,09	70
H	v 41 jr	Hirsutisme	87 kg	1,1	180
I	m 19 jr	8 dagen na strumectomie	75 kg	0,8	130

III. EXPERIMENTELE RESULTATEN

a. Thrombocyten.

De resultaten van het onderzoek naar de levensduur van de thrombocyten bij patienten A t. m. G zijn weergegeven in de figuren 5 en 6. De regressielijnen zijn getrokken volgens de methode van de kleinste quadraten. Slechts bij enkele bepalingen was het nodig een correctie aan te brengen voor de gevonden bijmengingen. De hoeveelheid bij elke bepaling geisoleerde thrombocyten en de gevonden bijmengingen zijn te vinden in tabel XV (zie pag. 92). Als nulpunt werd telkens het uur van inspuiting gekozen. Over het algemeen is er een goede correlatie tussen de waarden, indien zij uitgedrukt worden per aantal thrombocyten en per g N. De spreiding van de resultaten is in het laatste geval wat groter. Waarschijnlijk zijn de resultaten van de stikstofbepalingen iets onnauwkeuriger, omdat zich hierbij enige technische moeilijkheden voordeden. Zo was het soms moeilijk een homogene oplossing van de thrombocyten in de 30% NaOH te krijgen. Ook werd de bepaling soms bemoeilijkt door de Na_2SO_4 kristallen, die bij het neutraliseren ontstonden. Verder zijn enige N-bepalingen van experimenten C en F verloren gegaan, waardoor deze curven waarschijnlijk

minder nauwkeurig zijn. Bij enkele nog later na inspuiting verrichte bepalingen, welke niet in de figuren weergegeven zijn, werd toch nog enige activiteit gevonden, die meestal te gering was om nauwkeurig gemeten te kunnen worden en voor een deel aan bijmenging met erythrocyten moet worden toegeschreven. Het bestaan van enige restactiviteit in de thrombocyten is echter niet helemaal uitgesloten.

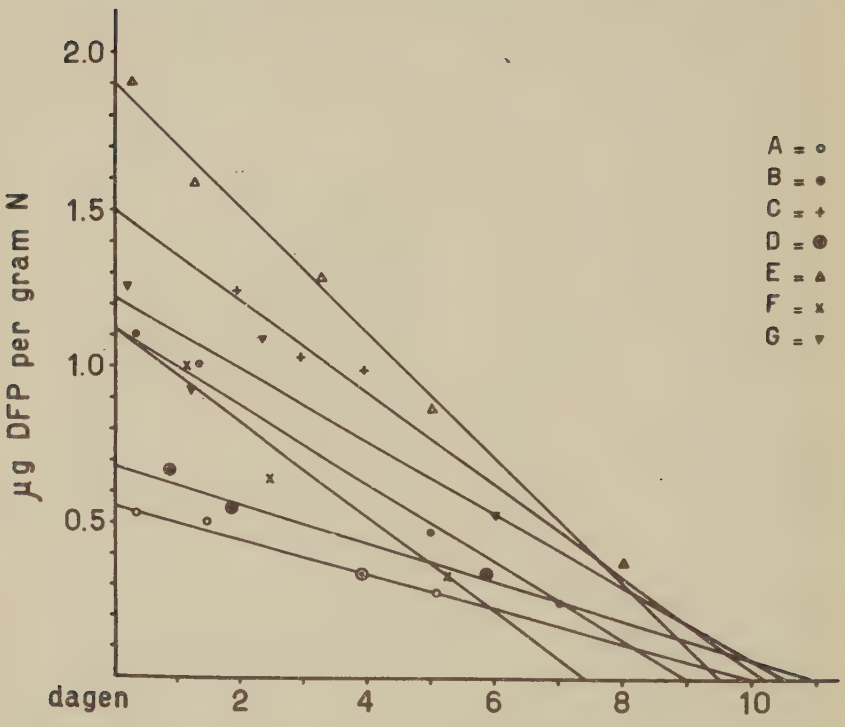


Figuur 5. Verloop van de aan de thrombocyten gebonden activiteit in µg DFP^{32} per 5.10^{12} thromb. De lijnen zijn getrokken volgens de methode van de kleinste quadraten.

b. Leucocyten.

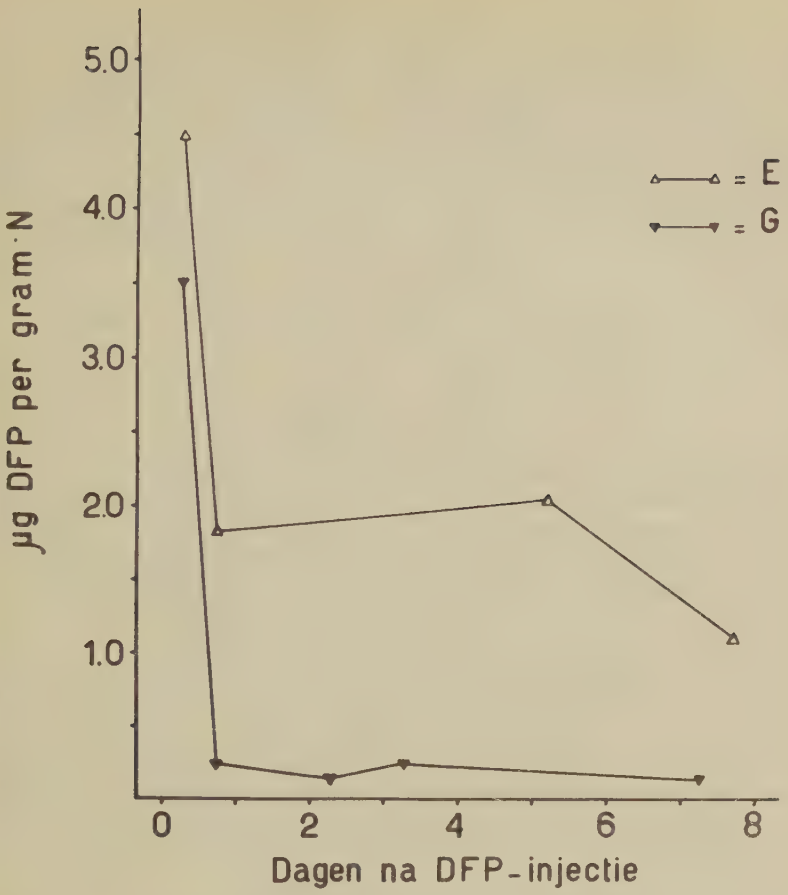
De resultaten van het onderzoek naar de leucocyten bij patient E en G zijn weergegeven in figuur 7. Ook bij patient B, D, H en I werden enkele gegevens verzameld die te vinden zijn in tabel XVI.

Het aantal leucocyten en het bloedbeeld tijdens het onderzoek zijn te vinden in tabel XVII (zie pag. 93)



Figuur 6. Verloop van de aan de thrombocyten gebonden activiteit in µg DFP^{32} per g N. De lijnen zijn getrokken volgens de methode van de kleinste quadraten.

Aanvankelijk werden bij het resuspenderen van de leucocyten na isoleren veel moeilijkheden ondervonden. Dit kon bij patient H en I voorkomen worden door voor het resuspenderen een oplossing van 1% sequestrene Na in physiologisch zout te gebruiken. De stikstofbepalingen leverden hier in tegenstelling met die bij de thrombocyten geen moeilijkheden op. Bij patient F, bij wie ook een bepaling in de leucocyten geschiedde, zijn de stikstofbepalingen verloren gegaan; de resultaten van de activiteitsmetingen deden evenwel een soortgelijke verloop als bij de andere patienten veronderstellen (hoge activiteit na 6 uur, zeer geringe na 24 uur). Behalve bij patient B waren de gevonden waarden, uitgedrukt per g N, na 6 uur aanzienlijk hoger dan in de andere vormelementen en het plasma; misschien vormt de relatieve lymfocytose van patient B een



Figuur 7. Verloop van de activiteit in de leucocyten bij patient G en E (Chronische myeloide leukaemie). Activiteit uitgedrukt in µg DFP per g N van de leucocyten.

TABEL XVI

HOEVEELHEID AAN DE LEUCOCYTEN GEBONDEN ACTIVITEIT IN µg DFP PER g N OF PER 10^{10} LEUCOCYTEN, BEPAALD OP VERSCHILLENDE UREN NA INSPUITING

Patient	Geinjiceerde dosis DFP^{32} in mg	Aantal uren na inspuiting	P^{32} in µg DFP per g N	P^{32} in µg DFP per 10^{10} leuc.
B.	0,654	5	1,08	
		29	-	
D.	0,411	$6\frac{1}{2}$	1,32	
		31	-	
H.	0,8	7	5,6	0,84
I.	1,1	7	3,86	0.45
		13		0.35

TABEL XVIII

OPNEMING VAN DFP^{32} IN µg PER g N IN THROMBOCYTEN EN ERYTHROCYTEN

Patient	Aantal uren na inspuiting	Haemolysaat	Thromb. µg DFP^{32}/g N	thromb./erythr. x 100%
A.	24	1.52	0,68	45
B.	6	1,34	1.11	83
D.	6	1.06	0.53	50
E.	6	2.20	1.90	86
G.	6	2.36	1.25	53

verklaring voor de lage bij hem gevonden waarde. Na een dag was bij alle patienten, bij wie dit nagegaan werd, behalve bij E, nog slechts zeer geringe activiteit aanwezig (enkele cnts. min.).

IV. BESPREKING VAN DE RESULTATEN

Uit de bovengenoemde waarnemingen blijkt, dat een aanzienlijke opneming van DFP^{32} in de thrombocyten heeft plaatsgevonden. Daar voor de beoordeling van de geschiktheid van DFP^{32} voor het merken van de thrombocyten de verhouding

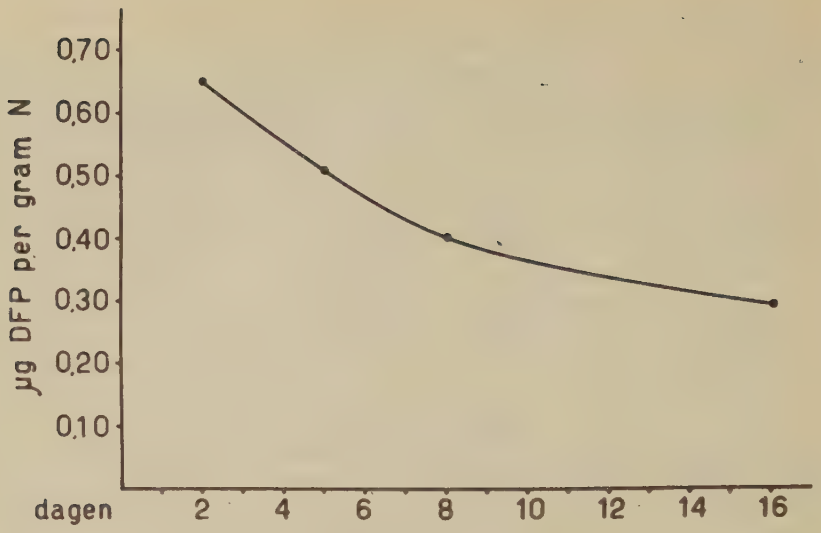
van de opneming in de erythrocyten en die in de thrombocyten van betekenis is, zijn in tabel XVIII naast elkaar weergegeven de opneming in de thrombocyten, welke bij de eerste bepaling na inspuiting gevonden werd, en die in het haemolysaat. Beide zijn uitgedrukt in µg DFP/g N. Uit de tabel blijkt dat de opneming van DFP^{32} in de thrombocyten per g N. ongeveer 50-80% is van die in de erythrocyten en dus voldoende om een betrouwbare meting mogelijk te maken. Het DFP^{32} gehalte van de haemolysaten veranderde gedurende de eerste 10 dagen na inspuiting slechts weinig. Verder blijkt uit de verkregen resultaten, zoals weergegeven in figuur 5 en 6, dat de daling van de activiteit een rechtlijnig verloop heeft. Dit wijst erop dat men gerechtigd is bij de thrombocyten van een levensduur te spreken. Ten aanzien van de overlevingsduur van een cel bestaan in principe twee mogelijkheden (210):

Ten eerste kan de gemiddelde levensduur van een cel slechts bepaald worden door endogene processen, zodat ook onder optimale omstandigheden het voortbestaan slechts gedurende een binnen vrij nauwe grenzen bepaalde tijd mogelijk is. Op een bepaald moment zal de celpopulatie dan opgebouwd zijn uit cellen van leeftijden welke variëren van 0 tot de levensduur van deze cellen. Van iedere leeftijd zullen evenveel cellen aanwezig zijn. Wanneer dan een aantal cellen zodanig met een radioactief isotoop gemerkt wordt dat hun levensduur niet beinvloed wordt, zal de daling van de radioactiviteit met de tijd lineair moeten verlopen.

In de tweede plaats kunnen de cellen beschouwd worden als potentieel onsterfelijk, maar voortdurend gevaar lopend vernietigd te worden door van buitenaf inwerkende invloeden, zodat het alleen afhangt van het toeval welke cellen afgebroken worden. Men spreekt dan van „random destruction". Indien hierbij aanmaak en afbraak met elkaar in evenwicht zijn, zal de celbevolking opgebouwd zijn uit cellen van leeftijden die variëren van 0 tot oneindig. Elke dag zal een gelijk percentage worden afgebroken van de aanwezige thrombocyten, dat wil dus zeggen een gelijk percentage van elke leeftijdsgroep. Wordt nu van elke leeftijdsgroep een gelijk percentage gemerkt, dan zal de daling van de activiteit een exponentieel verloop moeten hebben.

Dit nu blijkt niet het geval te zijn. Evenmin als de levensduur van de erythrocyten onder normale omstandigheden door exogene factoren bepaald wordt, is dit dus, op grond van de rechtlijnige curve, het geval voor de thrombocyten. Wel is te verwachten, dat onder bepaalde omstandigheden, naast het afsterven tengevolge van ouderdom, door inwerking van schadelijke factoren een „random destruction" van de thrombocyten voor zal komen.

Om het verschil in het verloop van de activiteit bij een exogeen bepaald verdwijnen en bij het verdwijnen tengevolge van ouderdom te demonstreren, is in figuur 8 als voorbeeld van



Figuur 8. Verloop van de aan het plasma gebonden radioactiviteit in g DFP^{32} per g N bij patient Ba., m 73 jr. lijdende aan diabetes mellitus. Ingespoten werd hier 1.1 mg DFP^{32}

het eerste het verloop van de aan plasma gebonden radioactiviteit bij een patient weergegeven. Bij vergelijking met de figuren 5 en 6 ziet men duidelijk het geheel andere verloop, dat de activiteit in het plasma neemt. De sterke daling van het aantal thrombocyten, die onder alle mogelijke omstandigheden niet alleen bij thrombopenische purpura, maar vooral ook bij infecties en operaties kan optreden, wijst erop, dat een dergelijke wijze van afbraak vaak kan voorkomen.

De helling van de curve, verkregen bij uitzetten van de activiteit per aantal thrombocyten, doet een levensduur van ongeveer negen dagen veronderstellen met een spreiding van ongeveer 8 tot 10 dagen. Ongeveer dezelfde uitkomst wordt verkregen, indien het verloop van de activiteit uitgezet wordt berekend per gram N., hoewel de spreiding iets groter is ($7\frac{1}{2}$-$10\frac{1}{2}$ dag). De gevonden waarden zijn misschien in enkele gevallen wat te hoog tengevolge van een bijmenging van andere cellen. Dit geldt vooral voor de later na inspuiting verkregen gegevens door de dan nog steeds hoge activiteit in de erythrocyten. De geringe activiteit, in enkele gevallen zelfs na negen dagen nog in de thrombocyten aangetoond, zal ten dele hiermee verklaard kunnen worden. Het uitdrukken van de gevonden waarden per gram N. is waarschijnlijk niet alleen minder betrouwbaar door de technische moeilijkheden van de N-bepaling, maar ook omdat de esterase-activiteit in hoofdzaak gelocaliseerd is in de membraan van de cellen (214) en dus ook het DFP. Lysis zal dus minder invloed hebben op de uitkomsten,

indien deze weergegeven zijn per aantal thrombocyten (de membraan blijft bij de lysis bestaan), maar wel op de N-bepalingen.

De blijkbaar geringe of ontbrekende nalevering van gemerkte thrombocyten uit het beenmerg is theoretisch als volgt te verklaren. DFP bindt zich in het algemeen vrijwel uitsluitend aan de membraan van de cellen (211) in dit geval met die van de megakaryocyten van het beenmerg, Deze membraan met de hieraan gebonden radioactiviteit zal bij uitzwermen van de thrombocyten in het beenmerg achterblijven.

De levensduur van de thrombocyten van de twee patienten met polycythaemia vera en chronische myeloide leukaemie komt overeen met die van gezonden. Misschien hangt de normale waarde bij de leukaemie patient samen met het ontbreken van miltvergroting. Onderzoek van de levensduur van de erythrocyten bij chronische myeloide leukaemie gaf meestal een verkorte, soms een bijna normale waarde (216). De levensduur van de erythrocyten bij polycythaemia vera is normaal (215). Om na te gaan of de resultaten niet beinvloed werden door de hoeveelheid ingespoten DFP^{32}, werden aan de patienten zeer uiteenlopende doseringen gegeven. De grote verschillen in ingespoten hoeveelheid DFP en radioactiviteit, welke te zien zijn in de tabellen zijn niet van invloed geweest op de resultaten. Dit doet veronderstellen, dat de toxische werking van het DFP of de radioactiviteit in de gebruikte dosering de levensduur van de thrombocyten niet wijzigt.

Veel minder dan bij de thrombocyten kunnen uit de experimentele resultaten verkregen bij het onderzoek van de leucocyten conclusies getrokken worden over de levensduur van de leucocyten. Hiervoor is het aantal waarnemingen te gering en is het verloop van de activiteit gedurende de eerste 24 uur na inspuiting op te weinig tijdstippen gecontroleerd. Wel kan men zeggen, dat de activiteit in de leucocyten, indien zij uitgedrukt is per gram stikstof 6 uur na inspuiting heel hoog is, hoger dan in de erythrocyten, thrombocyten en plasma. Deze hoge activiteit kan een correctie voor de op datzelfde tijdstip gevonden activiteit van de thrombocyten nodig maken, zoals bij patient F het geval was. Dat deze hoge activiteit een gevolg is van een te vroeg afnemen van bloed na inspuiting, lijkt niet waarschijnlijk, daar noch de thrombocyten noch het plasma op dat tijdstip een dergelijke hoge activiteit, vergeleken met de later gevonden waarden, te zien gaven. Ook is duidelijk, dat na 24 uur de activiteit in alle gevallen sterk gedaald is; alleen bij patient E blijft langere tijd een aanzienlijke activiteit bestaan, een activiteit die zo groot is, dat zij zeker geen gevolg kan zijn van bijmenging van erythrocyten of thrombocyten. Om te zien of nalevering uit het beenmerg hiervan de oorzaak kon zijn, werd 7 dagen na inspuiting een suspensie van beenmergcellen bereid, zoals beschreven staat in hoofdstuk 5. Zij werd op dezelfde wijze als hierboven beschreven is voor de leuco-

cyten uit het periphere bloed, van erythrocytenbijmenging gezuiverd. Deze suspensie bevatte ongeveer 1 erythrocyt op 25 leucocyten. Het DFP-gehalte bedroeg 0,55 µg DFP per gram N, een waarde die lager was, dan die welke de volgende dag in de leucocyten van het periphere bloed gevonden werd (1.1 g DFP per g N). Enige activiteit in de cellen van het beenmerg is er dus wel. Deze is waarschijnlijk niet voldoende om alle in het periphere bloed aanwezige activiteit in de leucocyten te verklaren.

Uit het bovenstaande volgt, dat zeker een binding van DFP met de granulocyten plaats vindt, en dat deze activiteit steeds na 24 uur bijna geheel verdwenen is. Dit zou er op kunnen wijzen, dat de gemerkte leucocyten tussen 6 en 24 uur na inspuiting afgestorven zijn of de bloedbaan verlaten hebben. Bij een geval van chronische myeloide leukaemie zou dit slechts voor een deel van de cellen kunnen gelden, een ander deel zou nog langer in de circulatie aanwezig kunnen zijn. Dat nalevering uit het beenmerg hiervoor alleen verantwoordelijk zou zijn, kon niet bewezen worden.

V. BEPALING VAN HET BESTRALINGSRISICO

Het leek ons van belang te bepalen, aan welke bestralingsdosis het lichaam door DFP^{32} in de door ons gebruikte dosering blootgesteld wordt. P^{32} zendt alleen een beta-straling uit. De bestralingsdosis kan dus niet in röntgen (r) worden aangegeven, daar deze alleen gedefinieerd is voor röntgen- en gammastraling. Oorspronkelijk is voor beta-straling de rep (Röntgen equivalent physical) ingevoerd: 1 rep is de dosis, die een weefsel krijgt als daarin evenveel stralenenergie wordt geabsorbeerd als bij een dosis van 1 r. De hoeveelheid stralenenergie die bij een dosis van 1 r wordt geabsorbeerd, wordt echter mede bepaald door de meer of mindere hardheid van de straling, en kan daarom variëren van 83-93 ergs per gram. Daarom wordt de laatste tijd als eenheid gebruikt de rad, d. i. de dosis die een weefsel krijgt als daarin 100 ergs stralenenergie per gram wordt geabsorbeerd. 1 microcurie P^{32} geeft in 1 gram weefsel een dosis van 73 $\bar{E}$ T = 73 x 0.7 x 14.3 = 730 rad, waarin $\bar{E}$ is de gemiddelde energie der beta-deeltjes (in M. e. a.); $\bar{E}$ is ongeveer 1/3 E_{max}; T is de halveringstijd van het isotoop in dagen. A microcurie P^{32} geeft dus gedurende t etmalen na inbrengen in B gram weefsel een dosis van:

$$\frac{A}{B} \times 730 \left[1 - e^{-\frac{0,693\ t}{14,3}} \right] \text{rad} \qquad \text{(I)}$$

Voor protectiedoeleinden is, behalve de dosis in bepaalde punten of onderdelen van het lichaam, ook de integrale of tota-

le lichaamsdosis van belang. Deze integrale dosis, vroeger uitgedrukt in gram-röntgen, wordt nu uitgedrukt in gram-rad. 1 μ e P^{32} levert een integrale dosis van 730 g rad, indien niets uitgescheiden wordt. Als A microcuries P^{32} het lichaam na t etmalen verlaten, dan geven zij een integrale dosis van:

$$730\ A \left[1 - e^{-\frac{0,693\ t}{14,3}}\right] g\ rad \qquad (II)$$

Het is ongewenst dat iemand meer dan 0.3 rad of 20.000 g rad per week ontvangt.

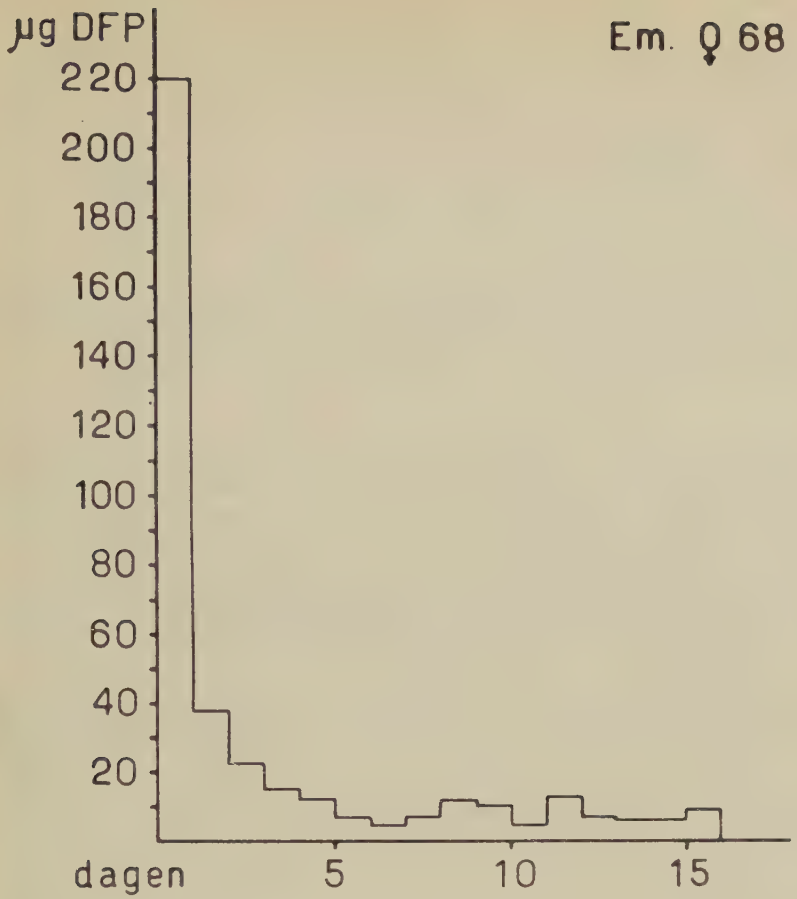
Uit de onderzoekingen van Jandorf e.a. (206) is gebleken, dat DFP^{32} niet gelijk over het gehele lichaam verdeeld wordt, maar dat bepaalde organen, zoals long, lever en nieren, betrekkelijk grote hoeveelheden opnemen, andere veel minder. Hierdoor is het onmogelijk om de door DFP^{32} aan het lichaam gegeven stralendosis nauwkeurig te berekenen. Toch is zij met behulp van formule I en de bekende uitscheiding van DFP enigszins te benaderen. De integrale dosis kan men berekenen zonder te weten hoe de verdeling van DFP over het lichaam is. Zo kan b.v. uitgerekend worden, welke dosis en welke integrale dosis de van dag tot dag uitgescheiden hoeveelheid P^{32} aan het lichaam gegeven heeft, wanneer wij aannemen dat alles telkens na 24 uur uitgescheiden wordt. Nemen wij als voorbeeld de uitkomsten van proef G. (figuur 9): hier werd gevonden dat de uitscheiding met de urine de eerste dagen resp. bedragen heeft 49; 8, 5; 5; 3, 5; 2, 5; 1,5% en de daaropvolgende dagen steeds ongeveer 2% van de ingespoten hoeveelheid. Ingespoten werd ong. 70 microcurie. De aan de patient gegeven dosis (in rad en g rad) is te vinden in onderstaande tabel, waarbij de uitscheiding met de faeces telkens gesteld is op 10% van die in de urine. Het totaal is sterk naar boven afgerond, omdat aangenomen werd dat na dertien dagen nog 7,5% in het lichaam aanwezig was en eerst de 50ste dag uitgescheiden werd.

Bij dit onderzoek waren dus zowel de totale dosis als de totale integrale dosis aanzienlijk kleiner dan de tolerantiedosis. Het laat zich berekenen dat bij een sterke afbraak van erythrocyten waarbij dus een concentratie van radioactief materiaal in de milt ontstaat, de aan de milt gegeven dosis niet ontoelaatbaar hoog wordt.

TABEL XIX

BESTRALINGSDOSIS ONTVANGEN DOOR PAT. G., BEREKEND UIT DE UITSCHEIDING VAN P^{32} MET DE URINE

Aantal etmalen na inspuiting	Gegeven dosis in rad	Gegeven integrale dosis in g rad
1	0,0161	1270
2	0,0055	440
3	0,0049	384
4	0,0041	319
5	0,0036	285
6	0,0028	212
7	0,0019	157
8	0,0040	306
9	0,0068	550
10	0,0028	216
11	0,0087	695
12	0,0052	396
13	0,0068	550
50	0,0480	3850
Totale dosis	0,1210	Totale integr. dosis 9630



Figuur 9. Uitscheiding in de urine van DFP, gemeten als P^{32}, bij patient G. Ingespoten werd hier 0.45 mg DFP^{32}.

Hoofdstuk 8

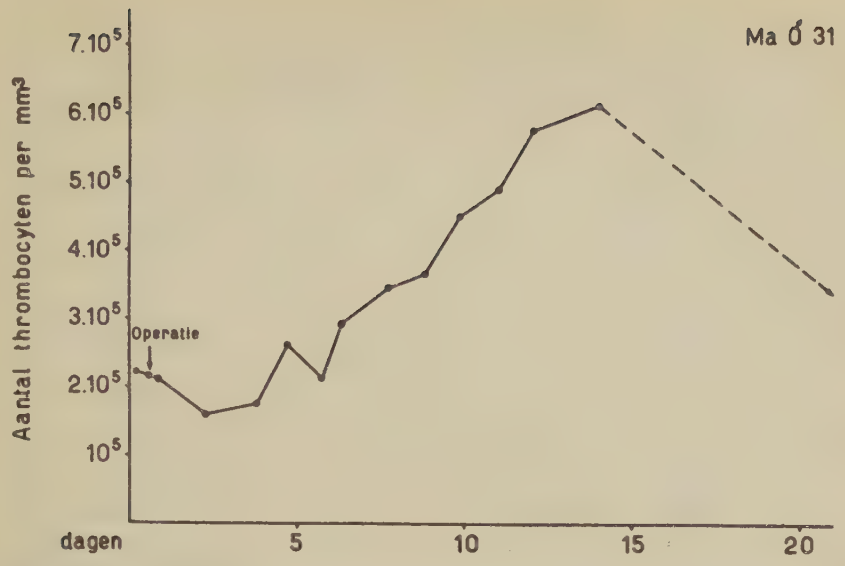
LEVENSDUUR VAN DE THROMBOCYTEN ONDER BIJZONDERE OMSTANDIGHEDEN

De in het vorige hoofdstuk beschreven experimenten tonen aan, dat thrombocyten met DFP^{32} kunnen worden gemerkt en dat op deze wijze hun levensduur bepaald kan worden. Nader onderzoek naar hun levensduur bij vermeerderde of verminderde aanmaak of afbraak is nodig. Reeds eerder is erop gewezen, dat onder velerlei omstandigheden grote veranderingen in het aantal van de in het periphere bloed aanwezige thrombocyten ontstaan.

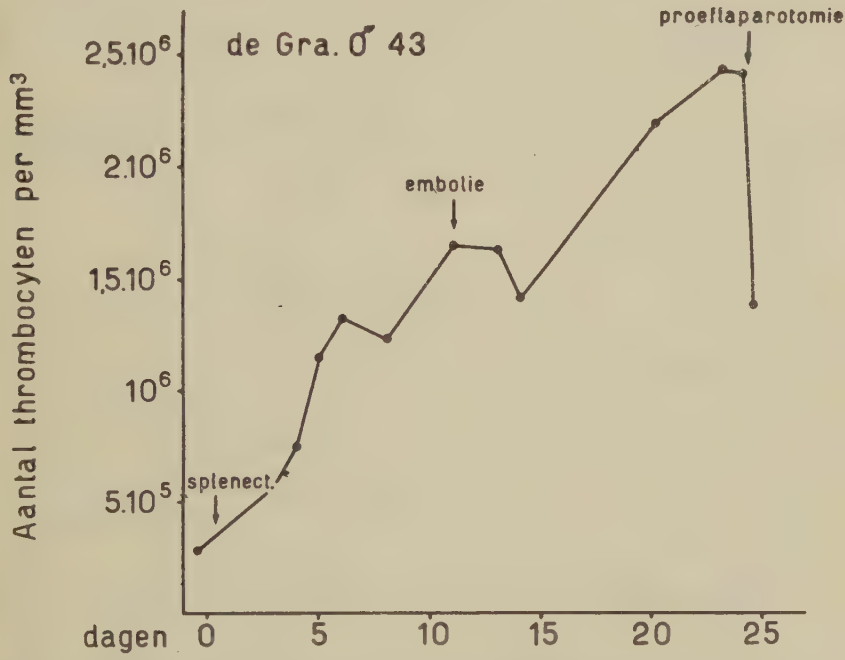
Bij operatiepatienten is dikwijls een onderzoek ingesteld naar het gedrag van de thrombocyten (8, 213, 217). Naar wij menen staat thans vast, dat tijdens of onmiddellijk na operatie het aantal thrombocyten gewoonlijk daalt. Dat deze daling geen gevolg van bloedverlies kan zijn, is bewezen (213). De 5de of 6de dag na operatie begint een stijging van het aantal thrombocyten, dat de 12de tot 14de dag zijn maximum bereikt; hierna daalt het aantal thrombocyten weer, om omstreeks de 21ste dag weer ongeveer even hoog te zijn als voor de operatie (8). Infecties, thrombosen en embolieën geven een daling gedurende de acute phase, gevolgd door een stijging bij genezing. Na miltextirpatie begint gewoonlijk het aantal thrombocyten onmiddellijk te stijgen tot een in het algemeen hoger niveau dan na andere operaties.

Ter illustratie van het bovenstaande zijn in figuur 10 en 11 twee curven van operatiepatienten weergegeven. Bij patient Ma. was een cholecystectomie verricht, het postoperatieve verloop was hier ongestoord. Patient de Gr. had een zeer sterke splenomegalie met een stuwing in het poortadersysteem; na de miltextirpatie ontstonden verschillende longembolieën. Wegens verschijnselen van een „acute buik" werd 24 dagen na de miltextirpatie een proeflaparotomie verricht, waarbij geen afwijkingen gevonden werden. Duidelijk is bij dit hoge aantal thrombocyten de sterke daling na deze tweede operatie.

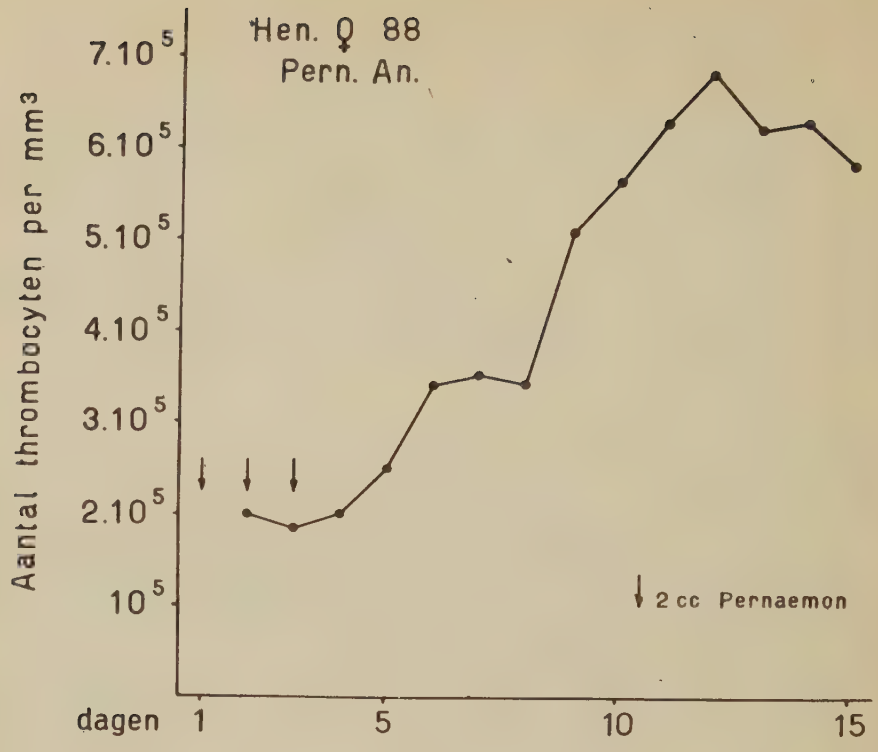
In figuur 12, 13, 14 en 15 zijn enige curven van patienten met pernicieuze anaemie weergegeven. In alle gevallen is de diagnose op het bloedbeeld en beenmergpunctaat gesteld en bevestigd door de reticulocytenstijging na toediening van leverpre-

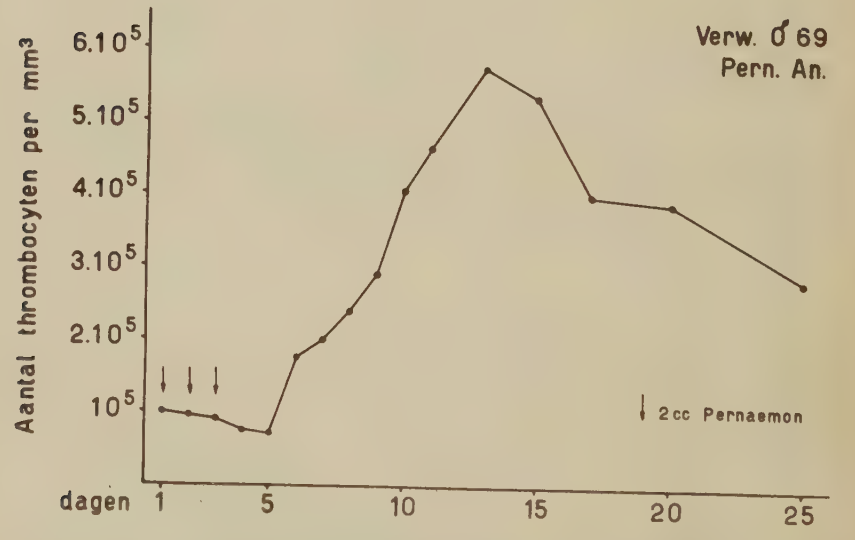


Figuur 10. Aantal thrombocyten per mm^3 gedurende de eerste weken na cholecystectomie bij patient Ma.

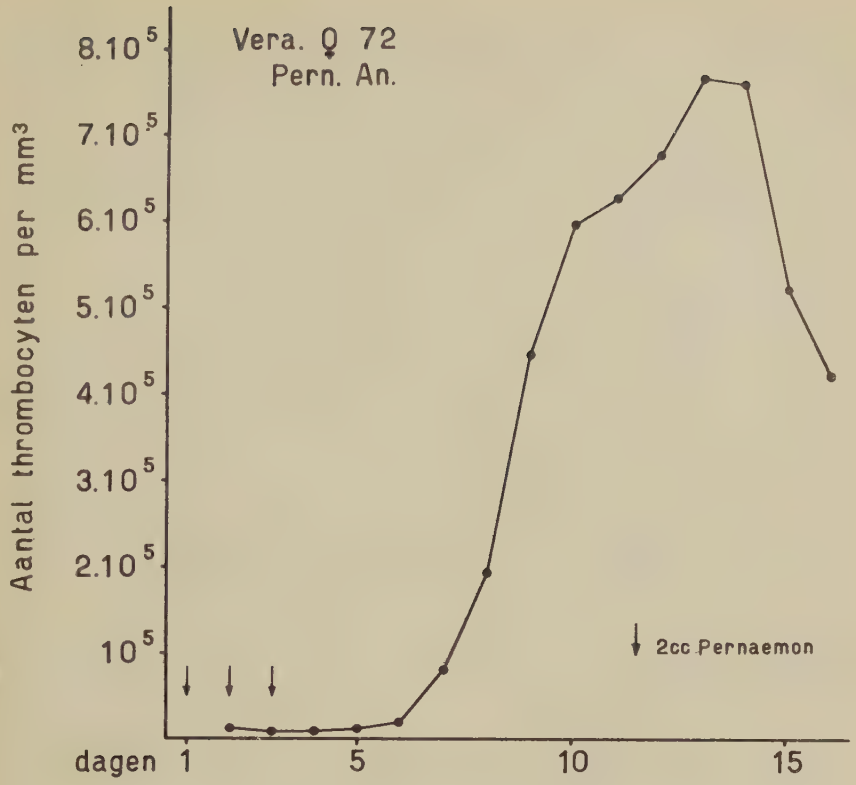


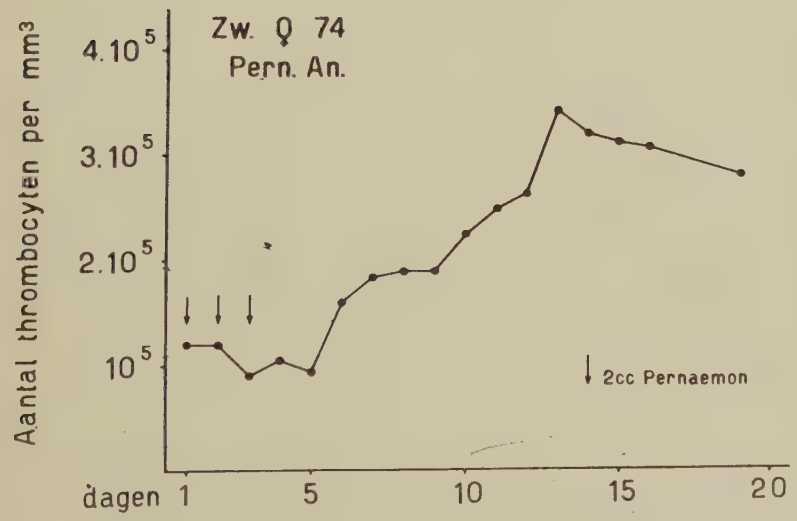
Figuur 11. Aantal thrombocyten per mm^3 gedurende de eerste weken na miltextirpatie bij patient Gr.





Figuur 12 en 13. Aantal thrombocyten per mm^3 gedurende de eerste weken na begin leverbehandeling bij patient Hen. en patient Verw.





Figuur 14 en 15. Aantal thrombocyten per mm^3 gedurende de eerste weken na begin leverbehandeling bij pat. Vera en Zw.

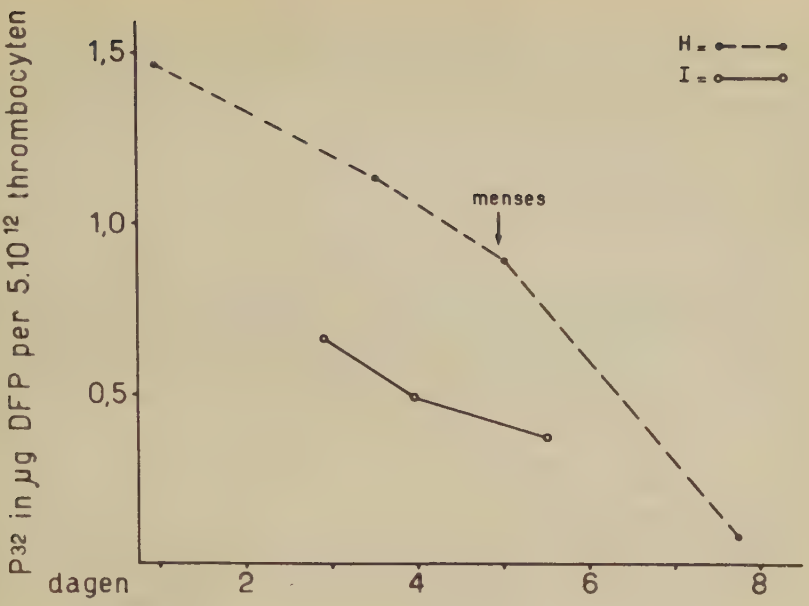
paraten. De resultaten van dit onderzoek komen overeen met wat in de literatuur hierover bekend is: vóór de behandeling is het aantal thrombocyten gewoonlijk lager dan normaal, de 5de tot 6de dag na instellen van de therapie begint een stijging; op de 14de tot 15de dag wordt een maximum bereikt (178).

De thrombocyten werden steeds in duplo geteld, met dezelfde pipetten volgens de methode van Feissly en Lüdin (69).

Ook bij patienten met ernstige bloedingen is gedurende de eerste twee weken na staken van de bloeding een dergelijk gedrag van de thrombocyten gevonden (179).

Op de duidelijke correlatie tussen de postoperatieve stijging van het aantal thrombocyten en de frequentie van de postoperatieve thrombosen en embolieën is door vele de aandacht gevestigd. De eerste vier dagen na operatie komen thrombosen en embolieën slechts weinig voor, daarna neemt de frequentie tot de twaalfde dag steeds toe, om vervolgens weer te dalen. Het is welhaast vergeten, dat men bij patienten met pernicieuze anaemie tijdens de thrombocytenstijging ook vaker thrombosen en embolieën heeft menen vast te stellen (212). Voorts is bekend de neiging tot thrombosen na bloedingen en in de tijd voor de menstruatie (219). De frequentie van thrombosen en embolieën is zeer hoog na miltextirpatie waar ook een zeer sterke stijging van het aantal thrombocyten bestaat.(146). De thrombocytenstijging is een van de belangrijkste afwijkingen in het stollingsmechanisme, die men bij operatiepatienten heeft kunnen aantonen (213). Een uitgebreid overzicht over factoren van invloed bij het ontstaan van thrombosen is door Ackroyd gegeven (214).

Wij willen hier nagaan, of het hierboven beschreven gedrag van de thrombocyten opgehelderd kan worden door de overlevingsduur van deze cellen in onze beschouwingen op te nemen. Bezien we figuur 12, 13, 14 en 15, dan zien wij hoe in alle gevallen het tijdsverloop tussen het begin en het einde van de thrombocytenstijging omstreeks 8 dagen bedraagt. Dit zou men als volgt kunnen verklaren: indien op een gegeven ogenblik een groot aantal cellen tegelijk wordt aangemaakt, zal na een tijdsverloop, overeenkomende met de gemiddelde levensduur van de cellen, een versterkte afbraak moeten optreden: dit zal zich in de curve als een afknikken of (indien tevens een verminderde productie ontstaan is) als een daling moeten manifesteren. Dit blijkt ook werkelijk het geval te zijn. Echter, wil deze redenering juist zijn, dan zullen enige andere mogelijkheden eerst uitgesloten dienen te worden. In de eerste plaats zal men moeten weten of de overlevingsduur van de thrombocyten onder deze omstandigheden niet veranderd is. In de tweede plaats is het mogelijk, dat de thrombocyten onder deze omstandigheden „at random" worden afgebroken. Te verwachten is dat onderzoek met DFP^{32} hierop enig licht zal kunnen werpen. Tot nu toe hebben wij pas bij één patient enige gegevens over de overlevingsduur van de thrombocyten na ope-



Figuur 16. Verloop van de aan de thrombocyten gebonden radioactiviteit in µg DFP^{32} per 5 x 10^{12} thrombocyten bij patienten H en I.

ratie kunnen verkrijgen. Deze zijn weergegeven in figuur 16. Het betrof hier een patient die DFP^{32} kreeg 8 dagen na strumectomie. Hoewel het aantal in het periphere bloed aanwezige thrombocyten niet geteld was, viel uit de hoeveelheid thrombocyten die bij isolatie steeds uit een zelfde hoeveelheid bloed verkregen werden (zie tabel XV) op te maken, dat postoperatief thrombocytenstijging optrad en dat 14 dagen na operatie het aantal zeer hoog was. De gevonden waarden geven geen reden om te veronderstellen, dat de levensduur aanzienlijk verkort was of dat de thrombocyten „at random" afgebroken werden. Onderzoek bij meer patienten zal dit nog moeten bevestigen. In figuur 16 is tevens weergegeven het verloop van de aan de thrombocyten gebonden radioactiviteit bij patient 1; dit was een vrouw met hirsutisme bij wie gedurende het onderzoek de menstruatie optrad, waarop microcurettage verricht werd. Hierbij ontstond een daling van het aantal thrombocyten in het periphere bloed, zoals bleek uit de sterke vermindering van de opbrengst aan thrombocyten bij isoleren verkregen. Het verloop van de activiteit wijst erop, dat deze daling waarschijnlijk veroorzaakt werd doordat de thrombocyten „at random" werden afgebroken.

De methode waarover men thans beschikt om thrombocyten te merken biedt vele mogelijkheden voor verder onderzoek. Niet alleen zal men de levensduur van deze cellen onder vele omstandigheden kunnen bepalen, maar ook mag men verwach-

ten, dat men door de thrombocyten te merken tijdens perioden van sterke stijging of daling van het aantal dezer cellen in het periphere bloed tui het verloop van de aan de thrombocyten gebonden radioactiviteit conclusies zal kunnen trekken over de wijze waarop deze veranderingen tot stand komen: Een daling die het gevolg is van een remming van het beenmerg zal een geheel ander verloop van de aan de thrombocyten gebonden radioactiviteit te zien geven, dan een die het gevolg is van een sterke afbraak van thrombocyten in het periphere bloed. Een betere analyse van de grote veranderingen in aantal thrombocyten, b. v. na operaties, zal wellicht meer licht kunnen werpen op enkele aspecten van het probleem van de postoperatieve en recidiverende thrombosen en embolieën.

SAMENVATTING

In dit proefschrift worden enige onderzoekingen over de biochemische eigenschappen van thrombocyten en leucocyten beschreven. Doel van dit onderzoek was na te gaan of op deze wijze meer inzicht verkregen kan worden over het gedrag van deze cellen onder physiologische en pathologische omstandigheden. Na een beknopt overzicht van de literatuur over de biochemie van thrombocyten en leucocyten (hoofdstuk 1 en 2) worden in hoofdstuk 3 en 4 de tot nu toe bekende methoden voor het isoleren van thrombocyten en leucocyten behandeld. In hoofdstuk 5 worden onze waarnemingen over het zure- en alkalische-phosphatasegehalte van de leucocyten beschreven. In overeenstemming met de bevindingen van Valentine e. a. werd bij patienten met polycythaemia vera een aanzienlijke vermeerdering van het alkalische-phosphatasegehalte van de leucocyten gevonden; bij patienten met chronische myeloide leukaemie een sterke daling. Verschillen in het zure-phosphatasegehalte van deze cellen konden niet aangetoond worden. In drie gevallen van myelofibrose werden normale waarden voor het alkalische-phosphatasegehalte van de leucocyten gevonden.

Om aan te tonen dat de gevonden verschillen niet op de aanwezigheid van een remstof of activator berusten werden enkele onderzoekingen verricht.

Bepaling van het phosphatasegehalte van de cellen geisoleerd uit het beenmerg gaf waarden in overeenstemming met die van het periphere bloed.

In hoofdstuk 6 wordt uitvoerig de door ons gebruikte methode voor het isoleren van de thrombocyten uiteengezet. De resultaten worden medegedeeld van enkele onderzoekingen naar de aanwezigheid van zure en alkalische phosphatase in thrombocyten waarbij saponine gebruikt werd om de thrombocyten tot lysis te brengen. Geen alkalische phosphatase activiteit maar wel een aanzienlijke zure phosphatase activiteit kon op deze wijze aangetoond worden. De eigenschappen van dit enzym werden bestudeerd; gevonden werd dat er een scherp pH optimum was bij pH 5.4, toevoeging van voor dit enzym gebruikelijke activatoren zoals magnesium en mangaan beinvloeden de activiteit niet. Het zure-phosphatasegehalte van de thrombocyten toonde geen verschillen onder pathologische omstandigheden. Om reproduceerbare waarden te verkrijgen

moesten alle voorzorgen in acht worden genomen om lysis van de thrombocyten tijdens het isoleren te voorkomen. In hetzelfde hoofdstuk worden tevens uitkomsten medegedeeld van enkele onderzoekingen over de opname van P^{32} in de thrombocyten. In overeenstemming met de waarneming van andere onderzoekers werd een aanzienlijke opname vastgesteld: op deze wijze was het niet mogelijk de aanwezigheid van een desoxyribonucleinezuur bevattende fractie in de thrombocyten aan te tonen.

In hoofdstuk 7 wordt een overzicht gegeven over de in de literatuur beschreven onderzoekingen over de levensduur van de thrombocyten en leucocyten. Vervolgens worden enkele eigenschappen beschreven van diisopropylfluorophosphonaat (DFP) en de overwegingen die ons ertoe gebracht hebben te onderzoeken of deze stof na merken met P^{32} gebruikt kan worden om deze cellen te merken. Daarna worden de uitslagen medegedeeld van een aantal onderzoekingen naar de levensduur van thrombocyten en leucocyten met DFP^{32}. Gevonden werd dat een aanzienlijke binding van DFP zowel met thrombocyten als leucocyten eiwitten plaats vindt. Deze binding bleek van dezelfde orde van grootte te zijn als die met de erythrocyten en het plasma. In figuur 5 en 6 zijn weergegeven het verloop van de aan de thrombocyten gebonden radioactiviteit. Dit verloop doet een levensduur van 8-9 dagen veronderstellen; er blijkt een lineair verband te zijn tussen de daling van de aan de thrombocyten gebonden radioactiviteit en de tijd verlopen na inspuiting. Hieruit volgt dat terecht gesproken kan worden van een overlevingsduur van deze cellen onder normale omstandigheden en niet van een door het toeval bepaald verdwijnen. De waarde voor de levensduur bij een patient met polycythaemia vera en een patient met chronische myeloide leukaemie verschilt niet met die bij normalen.

Zes uur na inspuiting werd steeds een hoge opname van DFP^{32} in de leucocyten gevonden. Deze opname was indien berekend per g N behalve in één geval steeds hoger dan in de andere vormelementen van het bloed. Na 24 uur was de meeste of bijna alle activiteit weer uit de leucocyten verdwenen. Slechts bij een patient met chronische myeloide leukaemie was er wel een steile daling gedurende de eerste 24 uur na inspuiting maar bleef er toch gedurende verscheidene dagen aanzienlijke activiteit in de leucocyten aan te tonen.

In hoofdstuk 8 wordt de betekenis van de levensduur van de thrombocyten besproken en wordt de door ons gevonden levensduur in verband gebracht met enkele bekende feiten van het gedrag der thrombocyten; zoals het gedrag na operaties en bij behandeling van perniciosapatienten. Hiervan worden enige voorbeelden gegeven en de aandacht wordt gevestigd op het feit dat het begin van de thrombocytenstijging en het einde hiervan onder deze omstandigheden komen met een tussenpoos overeenkomende met de levensduur van de thrombocyten. Er

wordt op gewezen dat dit te verklaren zou zijn door aan te nemen dat er onder deze omstandigheden ook een normale levensduur van de thrombocyten bestaat, waardoor een plotselinge sterk vermeerderde productie van thrombocyten na een tijdsverloop overeenkomende met deze gemiddelde levensduur door een versterkte afbraak gevolgd moet worden. Gewezen wordt op de mogelijkheid die bestaat om door de binding die DFP aangaat met de thrombocyten meer inlichtingen te verzamelen over de levensduur van de thrombocyten onder deze omstandigheden en de mogelijkheden die deze methode biedt voor een betere analyse van het gedrag van de thrombocyten. Tevens worden de eerste resultaten van onderzoekingen met DFP^{32} onder omstandigheden die gepaard gaan met een vermeerderde aanmaak of afbraak van de thrombocyten medegedeeld.

SUMMARY

The experiments reported in this thesis have been performed in order to investigate whether by analysing the biochemical properties of the platelets and leucocytes in the peripheral blood additional information can be obtained on the behaviour of these cells under physiological and pathological conditions. After a discussion of the literature pertinent to this subject (chapter 1 and 2) in chapter 3 and 4 methods mentioned in the literature for the isolation of leucocytes and platelets from peripheral blood are presented. In chapter 5 the method adopted by us for the isolation of leucocytes is described and our observations on their acid and alkaline phosphatase content are presented. In accordance with the findings of Valentine et al. a significant increase in alkaline phosphatase activity of the leucocytes of patients suffering from polycythemia vera as well as a decrease of this enzymatic activity in the cells of chronic myeloid leukemic patients was found. Under these conditions no differences in the acid phosphatase content of the leucocytes were demonstrable. In three cases of myelofibrosis normal values for the alkaline phosphatase content of the leucocytes were found. In some cases the same determinations in cells isolated from the bone marrow of these patients have been performed. These results are in substantial agreement with the values found in the peripheral blood.

In chapter 6 our method for the isolation of platelets is described in detail. The results are reported of some studies on the phosphatase content of platelets using saponine as a lysing agent. By this method a considerable amount of acid phosphatase activity was liberated. No alkaline phosphatase activity could be demonstrated. The acid phosphatase was characterized. It was found that there was a sharp optimum at pH 5,4; the activity of this enzyme is unaffected by magnesium or manganese ions. The acid phosphatase content of platelets did not vary under several pathological conditions. It was found that in order to get reproducible results great care should be taken to avoid lysis of platelets. In the same chapter the results are described of some experiments on the P^{32} uptake of platelets. In agreement with other investigators a considerable uptake was found. By this method it was not possible to demonstrate the presence of DNA phosphorus in platelets.

In chapter 7 a survey is given of the literature concerning

the life-span of leucocytes and platelets. It is stressed that until now very divergent results have been obtained. Some properties of DFP^{32} are discussed and the reasons are given why labelling of leucocytes and platelets with DFP^{32} suggested itself as a useful method for the determination of leucocyte and platelet survival time. Our results on the determination of platelet and leucocyte survival time after labelling with DFP^{32} are presented. A definite binding of DFP^{32} to proteins of platelets and leucocytes was observed. This binding was of the same magnitude as the binding of DFP^{32} to the erythrocytes and plasmaproteins. In figure 5 and 6 the slope of the curve of platelet-bound radioactivity versus time is shown. This slope suggests a life-span of 8-9 days. As the curves are all practically linear it seems reasonable to assume that a life-span of the platelets under normal circumstances exists. Therefore the disappearance of platelets from the bloodstream is not due to random destruction. The same values were obtained in one patient with polycythemia vera and one patient with chronic myeloid leukemia. In general there was a good correlation between the values found if these were expressed per g N or per number of platelets. After 24 hours most or nearly all activity had disappeared. In all cases 6 hours after injection there was a high uptake of DFP^{32} in the leucocytes. Except in one case this uptake was always higher than in the erythrocytes and platelets. In only one patient who had chronic myeloid leukemia although there was a steep decline during the first 24 hours after injection, a considerable activity could still be demonstrated during several days.

In chapter 8 the significance of the life-span of the platelets is discussed, and this life-span is related to some well known facts about the behaviour of the platelets after operations and during the treatment of pernicious anaemia patients with vit. B_{12}. Examples are given. Attention is called to the fact that the time from the start of the platelet-rise to the end corresponds to the life-span of the platelets. This could be explained by assuming that under these circumstances the platelets have their normal life-span. This implies, that after a sudden increase of platelet production, at an interval corresponding to the life-span of the platelets, the destruction of these cells must be stimulated. It is emphasized that the binding of DFP^{32} with the platelets can be used to collect more information about the life-span of the platelets under these circumstances and to get more detailed information about the behaviour of the platelets under abnormal conditions. The first results of experiments with DFP^{32} under circumstances where there is an increased production or destruction are discussed.

TABEL XV

TOTAAL AANTAL THROMBOCYTEN, LEUCOCYTEN EN ERYTHROCYTEN IN SUSPENSIE AANWEZIG : 10^6

Dag na insp.	Patienten A	B	C	D	E	F	G	H	I
1		Th 4980 L - E 0,7		Th 520 L 1,1 E 1,1	Th 10000 L 1,5 E 2,0	Th 20000 L - E -	Th 5220 L 0,8 E 0,5	Th 11200 L - E -	
2	Th 6210 L 0,9 E 2,7	Th 5400 L 1,8 E 1,5	Th 11400 L 0,85 E 3,6	Th 4800 L 0,53 E 1,3	Th 8590 L 0,52 E 2,4	Th 14000 L 0,44 E -	Th 7150 L 0,44 E 1,65		
3	Th 4800 L 0,48 E 2,0		Th 10800 L 1,15 E 1,75		-	Th 21900 L - E 0,9	Th 9884 L 2,64 E 2,4		Th 8700 L 0,36 E 4,8
4			Th 10450 L 0,72 E 1,44		Th 10700 L - E 0,9	Th 27000 L - E -		Th 11600 L 2,4 E 1,9	Th 14250 L 0,95 E 2,04
5	Th 6000 L 0,32 E 0,8	Th 6480 L - E 3,24	Th 10700 L 2,5 E 1,4					Th 6400 L - E 0,22	
6				Th 10360 L 1,0 E 0,5	Th 9260 L 0,5 E 2,0	Th 3250 L - E -			Th 22400 L - E 1,5
7	Th 7600 L - E -						Th 7300 L 1,3 E 3,2	Th 8000 L - E -	
8		Th 5480 L 1,9 E				Th 20500 L - E -			
9					7300 4,8 2,4				

TABEL XVII

AANTAL LEUCOCYTEN PER mm^3 CAPILLAIR BLOED EN DIFFERENTIEEL-TELLING TEN TIJDE VAN DE INSPUITING MET DFP^{32}

Patient	Dat.	Leucocyten per mm^3 cap. bloed	Differentieel-telling					
			Prometa-myelocyten	Staven	Eos.	Bas.	Polynucl.	Lymph.	Mon.
B	19-2 '54	6.400		1	2		37	56	4
D	19-2 '54	6.400			2		64c	26	8
E	14-6 '54	25.000	5	3	2.5	5	70	31	1
F	6-11 '54	11.300		3			70	24	3
G	28-2 '53	7.800		2	2		74	20	2

LITERATUUR

1. Dameshek, W.: J. A. M. A. 106: 1837, 1936.
2. Minot, G. R. en Buckman, T. E.: Am. J. M. Sc. 169: 477, 1925.
3. Morrison, F.: J. Lab. & Clin. Med.. 17; 1071, 1932.
4. Hayem, G.: Arch. de Physiol. norm. et path. 5: 692, 1878.
5. Jaffé, R. H.: Arch. Path. 20: 725, 1935.
6. Vaughan, J. M. en Harrison, C. V.: J. Path. & Bact. 48: 339, 1939.
7. Dameshek, W.: Blood 6: 372, 1951.
8. Wright, H. P.: J, Path. & Bact. 54: 461, 1942.
9. Hempelman, L. A., Reinhardt, E. H., Moore, C. V., Bierbaum, O. S. en Moore, S.: J. Lab. & Clin. Med.. 29; 1020, 1944.
10. Cohen, J. A. en Warringa, M. G. P. J.: J. Clin. Invest.. 33: 459, 1954.
11. Kempner, W.: J. Clin. Invest. 18: 291, 1939.
12. Zamecnik, P. C. en Baker, W. H.: persoonlijke mededeling aan Tullis, J. L. in Blood Cells and Plasma Proteins, Acad. Press Inc. New York, 1953, p. 270.
13. Weisberger, A. S.: J. Lab. & Clin. Med. 42: 964, 1953.
14. Valentine, W. N.: Blood 6: 845, 1951.
15. Code, C. F.: J. Physiol. 90: 485, 1937.
16. Graham, H. T., Wheelwright, F., Parish, Jr. H. H., Marks A. R. en Lowry, O. H.: Federation Proc. 11: 350, 1952
17. Code. C. F. en Mitchell, R. G.: Proc. Staff Meet., Mayo Clin. 29: 200, 1954.
18. Ehrich, W. E.: Science 118: 603, 1953.
19. Dempsey, E. W. en Wislocki, G. B.: Physiol. Rev. 26: 1, 1946.
20. Valentine, W. N., Lawrence, J. S., Pearce, M. L. en Beck, W. S.: Blood 10: 154, 1955.
21. Wagner, R.: Blood 2: 235, 1947.
22. Wachstein, M.: J. Lab. & Clin. Med. 31: 1, 1946.
23. Gibbs, R. P. en Stowell, R. E.: Blood 4: 569, 1949.
24. Rosenthal, M. C.: Bull. New England Med. Center 12: 154, 1950.
25. Valentine, W. N., Beck, W. S.: J. Lab. & Clin. Med. 38: 3, 1951.
26. Beck, W. S., Valentine, W. N.: J. Lab. & Clin. Med. 38: 245, 1951.

27. Valentine, W. N., Beck, W. S., Follette, J. H., Mills, H., Lawrence, J. S.: Blood 7: 950, 1952.
28. Valentine, W. N., Follette, J. H., Hardin, E. B., Beck, W. S., Lawrence, J. S.: J. Lab. & Clin. Med. 44: 219, 1954.
29. Valentine, W. N., Follette, J. H., Lawrence, J. S.: J. Clin. Invest. 32: 251, 1953.
30. Follette, J. H., Valentine, W. N. en Lawrence, J. S.: J. Lab. & Clin. Med. 40: 825, 1952.
31. Follette, J. H., Valentine, W. N., Hardin, E. B., Lawrence, J. S.: J. Lab. & Clin. Med. 43: 134, 1954.
32. Anlyan, A. J., Gamble, J., Hoster, H. A.: Cancer 3: 116, 1950.
33. Beck, W. S., Valentine, W. N.: Cancer Research 12: 823, 1952.
34. Beck, W. S., Valentine, W. N.: Cancer Research 12: 828, 1952.
35. Hardin, B., Valentine, W. N., Follette, J. H., Lawrence, J. S.: Am. J. M. Sc. 28: 73, 1954.
36. Contopoulos, A. N., Anderson, H. H.: J. Lab. & Clin. Med, 43: 134, 1954.
37. Swendseid, M. E., Wright, P. D., Bethell, F. H.: J. Lab. & Clin. Med. 40: 515, 1952.
38. Wagner, R.: Arch. Biochem. 26: 123, 1950.
39. Wagner, R., Reinstein, S. E.: Arch. Biochem. 29: 260, 1950.
40. Wagner, R., Yourke, A.: Arch. Biochem. 39: 174, 1952.
41. Martin, S.: persoonlijke mededeling aan Tullis, J. L. in Blood Cells and Plasma Proteins, Acad. Press Inc. New York 1953, p. 270.
42. Martin, P. S., Mc.Kinney, G. R., Becker, C. J.: J. Clin. Invest. 32: 1171, 1953.
43. Martin, P. S., Chaudhuri, S. N., Green, R., Mc. Kinney, G. R.: J. Clin. Invest. 33: 358, 1954.
44. Mc. Kinney, G. R.: Arch. Biochem. 46: 248, 1953.
45. Rossiter, R. J., Wong, E.: J. Biol. Chem. 180: 933, 1949.
46. Bergel, S.: Münch. med. Wchnschr. 56: 64, 1909.
47. Bridge, E., Holt, L. E.: J. Pediat. 27: 299, 1945.
48. Williams, M. J., Mendel, J. L.: Blood 9: 189. 1954.
49. Moloney, W. C., Lange, R. D.: Blood 633, 1954.
50. Spear, F.: Blood 3: 1055, 1948.
51. Zeller, H.: Deutsche med. Wchnschr. 47: 505, 1921.
52. Oleff, I.: Arch. Int. Med. 57: 1163, 1936.
53. Wright, J. H.: Virchows Arch. 186: 55, 1906.
54. Howell, W. H.: Morphol. 4: 117, 1890.
55. Rebuck, C. J. W.: J. Lab. & Clin. Med. 32: 660, 1947.
56. de la Fuente, V.: Blood 4: 614, 1949.
57. Diggs, L. W., Hewlett, J. S.: George Minot Symposion on Haematology 371, 1949.
58. Dameshek, W., Miller, E. B.: Blood 1: 27, 1946.
59. Fieschi, A.: Fourth congress of the European society of haematology. Adam 1953.

60. Tocantins, L. M.: Médicine 17: 155, 1938.
61. Brecher, G., Cronkite, E. P.: J. App. Physiol. 3: 365, 1950.
62. Kelly, A. R., Sturrock, R. M. en Gorski, L. B.: Federation Proc. 12: 393, 1952.
63. Robertis, E. De., Paseyro, P., Reissig, M.: Blood 8: 587, 1953.
64. Bessis, M. en Burnstein, M.: Rev. d'Hémat. 3: 48, 1948.
65. Bessis, M., Bricka, M.: Biochim. and Biophys. Acta. 2: 339, 1948.
66. Wolpers, C., Ruska, H.: Klin. Wchnschr. 18: 1077, 1939.
67. Tullis, J. L.: Blood Cells and Plasma Proteins, Acad. Press Inc. New York 1953.
68. Tocantins, L. M.: Arch. Path. 23: 850, 1953.
69. Feissly, R. en Lüdin, H.: Rev. d'Hémat. 4: 481, 1949.
70. Valentine, J., Conolly,: J. Lab. & Clin. Med. 42: 657, 1953.
71. Allen, V.: J. Lab. & Clin. Med. 12: 282, 1926.
72. Horwitz, S.: Ztschr. f. ges. exp. Med. 73: 432, 1930.
73. Oleff, I.: J. Lab. & Clin. Med. 23: 166, 1938.
74. Nijgaard, K.: Proc. Staff Meet. Mayo Clin. 9: 492, 1932.
75. Bizozzero, J.: Arch. Ital. Biol. 1: 12, 345, 1882.
76. Zucker, M. B.: Am. J. Physiol. 142: 12, 1944.
77. Ware, A. G., Fahey, J. L., Seegers, W. H.: Am. J. Physiol. 154: 140, 1948.
78. Chargaff, E., West, R.: J. Biol. Chem. 116: 236, 1937.
79. Paulssen, M. P.: Dissertatie Amsterdam 1951.
80. Budtz-Olsen, O. E.: Clot Retraction (Charles C. Thomas, Springfield, Illinois 1951).
81. Woods, M. C., Furth, J. Gamble, F. N., Bigelow, R. R.: Blood 6: 545, 1953.
82. Ross, M. H., Furth, J., Bigelow, R. R.: Blood 7: 417, 1952.
83. Brecher, G., Cronkite, E. P.: Proc. New York Path. Soc. 116: 51, 1950.
84. Spaet, T. H.: Blood 7: 404, 1952.
85. Jakson, S. H., Schneider, C. L.: Science 117: 229, 1953.
86. Hirsch, E. O., Gardner, F. H., Thomas, E. D.: J, Clin. Invest. 31: 638, 1952.
87. Maupin, B., Chary, R.: Rev. d'Hémat. 8: 302, 1953.
88. Endres, G., Kubowich, F.: Biochim. Ztschr. 191: 395, 1927.
89. Zucker, M. B.: Am. J. Physiol. 148: 275, 1947.
90. Rand, M., Reid, G.: Nature 168: 385, 1951.
91. Cohen, J. A. Persoonlijke mededeling.
92. Rappoport, M. M., Green, A. A., Page, P. H.: Science 108: 329, 1948.
93. Zamecnik, P. C., Baker, W. H., geciteerd door Alexander in Blood Cells and Plasma Proteins, Acad. Press Inc. New York 1953.
94. Wislocki, G. B., Rheingold, J. J., Dempsey, E. W.: Blood 4: 562, 1949.
95. Wachstein, M., Blood 4: 54, 1949.
96. Gibbs, L. B., Stowell, R. E.: Blood 4: 569, 1949.

97. Storti, E., Zubiani, M.: Bull. Soc. Med. Chir. Pavia 63: 127, 1949.
98. Storti, E., Perugini, S., Soldati, M.: Acta Haemat. 10: 144, 1953.
99. Rohr, K., Koller, F.: Klin. Wchnschr. 15: 1549, 1936.
100. Quattrin, N. H.: Acta Med. Scandinav. 129: 37, 1947.
101. Quattrin, N. H.: Acta Med. Scandinav. 134: 48, 1949.
102. Willi, H.: Folia haemat. 53: 426, 1935.
103. Voit, K.: Aertz. Forschung 2: 13, 1948.
104. Storti, E., Storti, R.: Mon. Zool. Ital. 45: 271, 1934.
105. Rheingold, J. J., Wislocki, G. B.: Blood 3: 641, 1948.
106. Guttmann, W.: Ztschr. f. inn. Med. 2: 362, 1947.
107. Zajicek, J., Datta, N., Acta Haemat. 9: 45, 1953.
108. Erf, L. A., Lawrence, J. H.: Ann. Int. Med. 15: 276, 1941.
109. Erf, L. A., Lawrence, J. H.: Ann. Int. Med. 15: 487, 1941.
110. Juliard, J., Maupin, B., Theilleux, R., Nau, P., Loverdo, A.: Sang 23: 336, 1952.
111. Wagner, R.: Arch. Biochem. 11: 249, 1946.
112. Mueller, J. F.: J. Lab. & Clin. Med. 40: 925, 1952.
113. van Oye, E. L.: Haematologica 31: 689, 1948.
114. Alexander, B.: in Blood Cells and Plasma Proteins. (Acad. Press Inc. New York 1953, p. 78).
115. Salvidio, E., Parreira, F.: Fourth congress of the European Soc. of Haemat. 1953.
116. Datta, N., Zajicek, J.: Acta Haemat. 12: 81, 1954.
117. Valette, G., Maupin, B. en Hindobro, H.: Soc. Biol. Paris 145: 313, 1951.
118. Koppel, J. L., Olwin, J. H.: Proc. of the Soc. for Exp. Biol. and Med. 86: 641, 1954.
119. Silvio, F., Meranza, D. R., Roth, K.; Science 115: 600, 1952.
120. Erickson, B. N., Williams, H. H., Avrin, I. en Lee, P.: J. Clin. Invest. 18: 81, 1939.
121. Haurowitz, F., Sladek, J.: Ztschr. f. Physiol. Chemie 173: 233, 1928.
122. Endres, G., Herget, L.: Ztschr. f. Biol. 88: 451, 1929.
123. Fujita, A.: Klin. Wchnschr. 7: 897, 1928.
124. Augustinsson, K. B., Datta, N., Grahr, M., Zajicek, J.: Nature 169: 800, 1952.
125. Bigelow, F. S.: J. Lab. & Clin. Med. 43: 759, 1954.
126. Simmons, B. S. en Everett, N. B.: Biochim. et Biophys. acta 13: 102, 1954.
127. Corham. A. T., Abels, J. C., Robins, A. L.: J. Clin. Invest. 21: 161, 1942.
128. Butler, A. M., Cushman, M.: J. Clin. Invest. 19: 459, 1940.
129. de Haan, J.: Arch. Néérlandaises de Physiol. 2: 671, 1918.
130. Vallee, B. L., Hughes, W. L., Gibson, J. G. H.: Blood 1: 82, 1947.
131. Li, J. G., Osgood, E. E.: Blood 4: 670, 1949.
132. Fahraeus, R.: Acta Med. Scandinav. 55: 3, 1921.
133. Minor, A. H., Burnett, L.: Blood 3: 799, 1948.

134. Buckley, E. S., Powell, M. J., Gibson, J. G. H.: J. Lab. & Clin. Med. 36: 29, 1950.
135. Tullis, J. L.: Blood 50: 854, 1952.
136. Martin, S.: persoonlijke mededeling aan Tullis, J. L. in Blood Cells and Plasma Proteins, Acad. Press Inc. New York 1953.
137. Tullis, J. L.: Blood 7: 891, 1952.
138. Tullis, J. L. in Blood Cells and Plasma Proteins, Acad. Press Inc. New York 1953.
139. Maupin, B., Chary, R.: Sang 23: 336, 1952.
140. Behrens, M., Taubert, M. H.: Hoppe Seylers, 289, 63, 1952.
141. Behrens, M., Taubert, M. H. Hoppe Seylers, 290: 228, 1952.
142. Agranoff, B. W., Vallee, B. L., Waugh, D. F.: Blood 9: 804, 1954.
143. Mosen, R.: Arch. f. Anat. und Physiol. abteilung 352: 1893.
144. Morawitz, P.: Deutsche Arch. f. Klin. Med. 79: 215, 1904.
145. Minor, A. H., Burnett, L.: Blood 7: 692, 1952.
146. Allen, E. V., Borker, N. W., Hines, E. A.: Peripheral Vascular Diseases, Philadelphia 1946.
147. Freeman, G.: Science 114: 527, 1951.
148. Tullis, J. L.: Blood Cells and Plasma Proteins Acad. Press Inc. New York 1953.
149. Dillard, G. H. L., Brecher, G., Cronkite, E. P.: Proc. Soc. Exp. Biol. & Med. 78: 796, 1951.
150. Tullis, J. L.: J. Am. J. Med. Sc. 226: 191, 1953.
151. Roche, J.: Biochim. J. 25: 1724, 1931.
152. Rossiter, R. J.: J. Physiol. 108: 14, 1949.
153. Cram, D., Rossiter, R. J.: Canad. J. of Research 27: 290, 1949.
154. Fiske, C. H., Subbarow, Y.: J. Biol. Chem. 66: 375, 1925.
155. Mortensen, O.: Acta med. Scandinav. 129: 547, 1948.
156. Weiskotten, H. G.: Am. J. Path. 16: 183, 1930.
157. Yoffrey, J. M.: J. Anat. 70: 507, 1935.
158. Adams, W. S., Saunders, R. H., Lawrence, J. S.: Am. J. Physiol. 144: 297, 1945.
159. Reinhardt, W. O.: Anat. Rec. 94: 197, 1946.
160. Lawrence, J. S., Ervin, D. M. en Wetrich, R. M.: Am. J. Physiol 144: 284, 1945.
161. Dijke, D. G. van, en Huff, R. L.: Am. J. Physiol. 165: 341, 1951.
162. Hirsch, E. C., Gardner, F. H.: J. Lab. & Clin. Med. 39: 556, 1952.
163. Lanman, J. T., Bierman, H. R., Byron, R. L.: Blood 5: 1099, 1950.
164. Bierman, H. R., Byron, R. L., Kelly, K. H., Dod, K. S. en Black, P. M.: Blood 6: 487, 1951.
165. Weisberger, A. S., Heinle, R. W., Storaasli, J. P. en Hannah, R.: J. Clin. Invest. 29: 336, 1950.

166. Seyderhelm, R. en Oesterreich, C.: Ztschr. f. d. ges. exper. Med. 56: 503, 1927.
167. Farr, R. S.: Anat. Rec. 109: 515, 1951.
168. White, L. P.: Blood 9: 73, 1951.
169. Boyd, G. A., Casarett, G. W., Altman, K. Y., Noonan, T. R., en Salomon, K.: Science 108: 529, 1948.
170. Esselier, A., Wagner, K.: Schweiz. Med. Wchnschr. 82: 526, 1952.
171. Kline, D. E., en Cliffton, E. E.: Science 115: 9, 1952.
172. Weisberger, A. S. en Levine, B.: Blood 9: 1082, 1954.
173. Hevesy, G., Ottosen, J.: Acta Physiol. Scandinav. 5: 237, 1943.
174. Sabin, F. R., Cunningham, R. S., Doan, C. A. en Kindwall, J. A.: Bull. Johns Hopkins Hosp. 37: 14, 1925.
175. Brecher, G.: Persoonlijke mededeling.
176. Bierman, H. R., Kelly, H., Cordes, F. H., Byron, R. L., Polhemus, P., Rappoport, S.: Blood 7: 683, 1952.
177. Hueck, H.: München. Med. Wchnschr. 51: 1869, 1925.
178. Kissmeyer Nielsen, F.: Acta med. Scandinav. 141, 125, 1951.
179. Desforges, J. F., Bigelow, F. S., Chalmers, Th. C.: J. Lab. & Clin. Med. 43: 501, 1954.
180. Dillars, G. H. L., Brecher, G., Cronkite, E. P.: Proc. Soc. Exper. Biol. and Med. 78: 796, 1951.
181. Hirsch, E. O., Gardner, F. H., Thomas, E. D.: J. Clin. Invest. 31: 638, 1952.
182. Harrington, W. J., Minnich, V., Hollingsworth, J. W. and Moore, C. V.: J. Lab. & Clin. Med. 38: 1, 1951.
183. Sprague, C. G., Harrington, W. J., Lange, R. D., Shapleigh, J. B.: J. A. M. A. 150: 1193, 1952.
184. Stefanini, M., Chatterjea, J. B., Dameshek, W., J. Clin. Invest. 30: 676, 1951.
185. Stefanini, M., Chatterjea, J. B., Dameshek, W., Zannos, L., Perez, S. E.: Blood 7: 53, 1952.
186. Stefanini, M., Dameshek, W.,: New England J. Med. 248: 797, 1953.
187. Woodard, H. Q.: Blood 5: 660, 1950.
188. Morgan, M. C., Keating, R. P., Reisner, E. H.: Proc. Soc. Exper. Biol. and Med. 85: 420, 1954.
189. Robertson, J. S., Milne, W. L., Cohn, S. H.: Radio Isotope Conference 1: 205, 1954.
190. Gurvitch, G., Nelken, F.: Nature 17: 356, 1954.
191. Stefanini, M., Plitman, G. J., Dameshek, W., Chatterjea, J. B., Mednicoff, J. B.: J. Lab. & Clin. Med. 42: 723, 1953.
192. Evans, R. S., Tahashi, K., Duane, R. T., Payne, R. en Liu, C. K.: Arch. Int. Med. 87: 48, 1951.
193. Duke, W. W.: J. Exp. Med. 14: 265, 1911.
194. Gardner, F. H., Howel, D., Hirsch, E. O.: J. Lab. & Clin. Med. 43: 196, 1954.
195. Lawrence, J. S., Valentine, W. N.: Blood 2: 40, 1947.

196. Tocantins, L. M.: Ann. Int. Med. 9: 838, 1936.
197. Hirsch, E. O., Favre-Gilly, L., Dameshek, W.: Blood 5: 568, 1950.
198. Odell, T. T., Gamble, F. N., Furth, J.: Federation Proc. 12: 399, 1953.
199. Odell, T. T., Tausch, F. J., Furth, J.: Federation Proc. 13: 440, 1954.
200. Udenfriend, S., Weisenbach, H.: Federation Proc. 13: 412, 1954.
201. Koelle, G. B., Gilman, A.: J. Pharmacol. & Exper. Therap. 87: 421, 1946.
202. Grob, D., Harvey, A. M.: Am. J. of Med. 14: 52, 1953.
203. Cohen, J. A.: Ned. Milit. Gen. Tijdschrift 5: 263, 1952.
204. Jansen, E. F., Nutting, M. D., Jang, R., Balls, A. K.: J. Biol. Chem. 179: 189, 1949.
205. Jansen, E. F., Nutting, M. D., Jang, R., Balls, A. K.: J. Biol. Chem. 185, 209, 1950.
206. Jandorf, B. J., Mc. Namarra, P. D.: J. Pharmacol. and Exper. Therap. 98: 77, 1950.
207. Holland, W. C., Greig, M. E.: Am. J. Physiol. 162: 610, 1950.
208. Thiele, E. H., Pennel, R. B.: Blood 9: 496, 1954.
209. Witte, B., Miller, J. S.: J. Am. Chem. Soc. 70: 3886. 1948.
210. Schiödt, E.: Acta med. Scandinav. 95: 49, 1938.
211. Cohen, J. A., Oosterbaan, R. A. en Warringa, M. G. P. J.: Arch. Internat. de Physiologie 62: 574, 1954.
212. Dijke, S. C., Stewart, W.: Lancet 1: 1080, 1931.
213. Warren, R., Lauridsen, J., Belko, J. S.: Circulation 7: 481, 1953.
214. Ackroyd, J. F. P.: Britt. Med. Bull. 1: 21, 1955.
215. London, J. M., Shemin, D., West, R., Rittenberg, D.: J. Biol. Chem. 179: 463, 1949.
216. Berlin, R.: Acta med. Scandinav. Suppl. 252, 1951.
217. Dawbarn, R. Y.: J. Path. & Bact. 31: 833, 1928.
218. Berlin, N. I., Lawrence, J. H., Lee, H. C.: J. Lab. & Clin. Med. 44: 860, 1954.
219. Mertz, W. K.: Helvetica Chirurgica Acta suppl. VI, 1949.
220. Weil Malherbe, H. en Bone, A. D.: Nature 174: 557, 1954.
221. Osgood, E. E., Tivey, H., Davison, K. B., Seaman, A. J. and Li, J. G.: Cancer 5: 331, 1952.
222. Schmidt, G., Tannhauser, S. J.: J. of Biol. Chem. 161: 83, 1945.

STATUSNUMMERS VAN PATIENTEN, BESCHREVEN IN HOOFDSTUK V

(G. Z. Z. = Gem. Ziekenhuis Zuidwal, Den Haag,
A. Z. = Academisch Ziekenhuis, Leiden)

De.	025317	'53	G. Z. Z.
Vi.	050907	'53	"
Pe.	058024	'54	"
Ha.	055373	'53	"
Ga.	086154	'53	"
Ta.	092513	'53	"
Pe.	3540	'51	A. Z.
Bre.	260	'54	A. Z.
Ba.	pat.		Mil. Hospitaal, Den Haag.
He.	04284	'51	G. Z. Z.
Du.	034669	'52	"
Bu.	029773	'52	"
v. O.	041805	'51	"
Die.	056663	'53	"
Be.	042286	'54	A. Z.
Re.	18628	'54	G. Z. Z.
Sch.	046201	'52	"
Gem.	048403	'53	"
Ball.	173	'54	A. Z.
N.de J.	2446	'53	"
Ke.	468	'51	"
St..	43297	'52	G. Z. Z.
Bo.	89906	'53	"
Vera.	56282	'53	"
Mo.	040995	'52	"
Bo.	064136	'52	"
Mo.	056469	'53	"
Fra.	041975	'52	"
We.	050425	'53	"
Bra.	056441	'53	"
End.	039872	'52	"
To.	042985	'52	"

HOOFDSTUK VI

Die.	056663	'53	G. Z. Z.
Du.	034669	'52	"
He.	04284	'52	"
Ga.	086154	'53	"
De.	025317	'53	"
Gro.	054812	'53	"
Po.	049273	'52	"
Wa.	054848	'53	"
Ji.	054533	'53	"
Pa.	05697	'53	"
v. Gem.	027482	'53	G. Z. Z.
Jo.	056383	'52	"
He.	056561	'53	"
Pen.	093599	'53	"
Ho.	043384	'53	"
Vu.	049796	'53	"
Oud.	056857	'53	"
Sp.	044387	'53	"
v.d. Gr.	053371	'53	"

HOOFDSTUK VII

Emm.	051751	'53	G. Z. Z.
v. Sp.	1593	'54	A. Z.
Vos.	1056	'54	"
v. d. Berg	042286	'54	G. Z. Z.
Blo.	012775	'54	"
He.	1807	'54	A. Z.
Bre.	260	'54	"
Bu.	107	'55	"
de Ru.	1806	'54	"
Ba.	051962	'53	G. Z. Z.

HOOFDSTUK VIII

Vera	056282	'53	G. Z. Z.
Verw.	051700	'53	"
Ma.	048769	'53	"